T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

TİP2 DİABETES MELLİTUS'DA MİTOKONDRİYAL GEN POLİMORFİZMLERİNİN SUBKLİNİK POLİNÖROPATİ GELİŞİMİNE ETKİSİ

ALİ IŞIKLI

DANIŞMAN
DOÇ. DR. ELİF ÖZKÖK

SİNİRBİLİM ANABİLİM DALI
SİNİRBİLİM PROGRAMI

İSTANBUL-2015

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Sinirbilim Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programında Ali Işıklı tarafından hazırlanan Tip2 Diabetes Mellitus'da Mitokondrial Gen Polimorfizmlerinin Subklinik Polinöropati Gelişimine Etkisi"" başlıklı Yülsek Lisans tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

11 / 09 / 2015

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı) İmzası

1.Doç.Dr.Elif ÖZKÖK İ.Ü DETAE Sinirbilim Anabilim Dalı

2.Prof. Dr. İlhan YAYLIM İ.Ü. DETAE Moleküler Tıp Anabilim Dalı

3.Doç. Dr. Esra GÜRSOY Bezmialem Ün. Tıp.Fak Nöroloji Anabilim Dalı

4.Prof.Dr.Bedia ÇAKMAKOĞLU İ.Ü. DETAE Moleküler Tıp Anabilim Dalı

5.Prof. Dr. H.Arzu ERGEN İ.Ü. DETAE Moleküler Tıp Anabilim Dalı

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Ali IŞIKLI



İTHAF

Aileme ve bilim dünyasına ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Sinirbilim yüksek lisana eğitimimin her aşamasında bana en büyük desteği ve emeğini veren ve her aşamada beni motive eden danışmanım ve saygı değer hocam Doç. Dr. Elif Özkök'e,

Tez çalışmam boyunca her türlü klinik desteği veren İstanbul Tıp Fakültesi İç hastalıkları Genel Dahiliye servisinde görevli Prof. Dr. Sacide Erden ve Metabolizma Hastalıkları ve Endokrinoloji servisinde görevli Doç. Dr. Ayşe Kubat Üzüm'e,

Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Erdem Tüzün hocamıza, anabilim dalımıza emek veren hocalarımız ve beraber çalıştığım arkadaşlarıma,

Bölümümüze akademik olarak her türlü desteği sağlayan diğer bölümlerdeki hocalarıma, enstitümüzde bulunan kan alma sevisinde görev yapmış emekli hemşire Mircan Topaç'a,

Ayrıca bugünlere gelmemde destek ve sevgileriyle her zaman yanımda olan sevgili aileme,

Sonsuz teşekkürler ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi, ÖNAP projesi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 17429

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI ..... İİ
BEYAN ..... İİİ
İTHAF ..... İV
TEŞEKKÜR V
İÇİNDEKİLER ..... Vİ
TABLOLAR LİSTESİ ..... Vİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... Vİİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ ..... İX
ÖZET X
ABSTRACT ..... Xİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
3. GEREÇ VE YÖNTEM 17
4. BULGULAR 29
5. TARTIŞMA 35
KAYNAKLAR 39
FORMLAR 44
ETİK KURUL KARARI 50
ÖZGEÇMİŞ 51

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo.2.1. Diyabetes Mellitus'un Tanı Kriterleri 3
Tablo.2.2. Diyabetik nöropatiler 5
Tablo.2.3. Diyabetik nöropatilerin fizyopatolojik klasifikasyonu 10
Tablo 3.1: Hasta ve Kontrol Bilgileri 18
Tablo 3.2: Primer Sıralamaları 23
Tobla 3.3: Primer Dizileri 23
Tablo 4.1: Hasta ve Sağlıklı olguların biyokimya değerleri 29
Tablo 4.2: Kontrol ve tüm diyabetli hasta SNP karşılaştırma 33
Tablo.4.3: Kontrol ve Diyabetik Nöropatisiz hasta SNP karşılaştırma 34
Tablo.4.4: Kontrol ve Diyabetik Nöropatili hasta SNP karşılaştırma 34

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 3.1: Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Şematik Gösterimi 25
Şekil 3.2: Dizileme Basamakları 27
Şekil.4.1: Soğuk-Titreşim-Sıcak duyu testi (Cooling-Vibration-Warming Computed Threshold) El: tüm gruplar 30
Şekil.4.2: Soğuk-Titreşim-Sıcak duyu testi (Cooling-Vibration-Warming Computed Threshold) Ayak: tüm gruplar 31
Şekil.4.3: Soğuk-Titreşim-Sıcak duyu testi (Cooling-Vibration-Warming Computed Threshold) El: kontrol ve tüm diyabetik olgular 31
Şekil.4.4: Soğuk-Titreşim-Sıcak duyu testi (Cooling-Vibration-Warming Computed Threshold) Ayak: kontrol ve tüm diyabetik olgular 32

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ADA: American Diabetes Association

BOS: Beyin-Omurilik Sıvısı

CIDP: Kronik İnflamatuvar Demyelinizan Polinöropati

DRG: Dorsal Kök Ganglion Hücreleri

DM: Diabetes Mellitus

DN: Diyabetik Nöropati

DNF: Diyabetik Nefropati

DPN: Diyabetik Polinöropati

ETZ: Elektron Taşıma Zinciri

HDL: Yüksek Dansiteli Lipoprotein

IGT: Bozulmuş Glukoz Toleransı

LDL: Düşük Dansiteli Lipoprotein

MnSOD: Mangan Süperoksit Dismutaz

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

QST: Sayısallaştırılmış Duyu Testi

ROS: Reaktif Oksijen Türevleri

SİRT. Sirtuin

SNP: Tek Nükleotid Polimorfizm

UCP: Eşleme Bozucu Protein

ÖZET

Işıklı A. Tip 2 Diabetes Mellutus (DM)'da Mitokondriyal Gen Polimorfizmlerinin Subklinik Polinöropati Gelişimine Etkisi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Sinirbilim ABD. Yüksek Lisans Tezi İstanbul. 2015

Diyabet insan vücudunun pek çok dokusunu etkilediği gibi sinirleri de etkilemektedir ve diyabetik polinöropati insan yaşamını olumsuz etkileyen bir hastalıktır. Özellikle diyabetik polinöropati el ve ayaklarda duyularda hassasiyet azalması ve kaybı, ağrı, sinir dejenerasyonuna neden olmaktadır. İlave olarak mitokondrial bozuklukların birçok hastalıklarla ilişkilendirildiği gibi diyabetik nöropatide de rollerinin olabileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda 31 kişi sağlıklı, Uluslararsı DN4 ağrı skalasına göre değerlendirilmiş 18 nöropatisi olmayan ve 10 diyabetik nöropatili hastaya ince ve kalın lif nöropatisinin saptanması amacıyla sayısallaştırılmış duyusal test (QST) uygulandı. Böylece diyabetin ve diyabetik polinöropatinin duyular üzerine olan etkileri gözlemlenmeye çalışıldı. Ek olarak, Mangan Süperoksit Dismutaz (MnSOD), Eşleme Bozucu Protein-1-2-3 (UCP-1, UCP-2, UCP-3) ve Sirtuinlerin (Sirt-1, Sirt-3, Sirt-4) polimorfik varyantları belirlenmiştir.

Sonuç olarak diyabetli hastaların sayısallaştırılmış duyu testinde belirgin olarak yüksek sonuçlar verdiğine ulaşıldı. Hem el hem de ayaklardan elde edilen sonuçlar diyabete bağlı polinöropatinin duyusal hassasiyeti azalttığı saptanmıştır. Antioksidan gen varyantlarına bakıldığında ise tüm diyabetlilerde UCP 2 geninin rs760207 (G/C), rs2632725 (A/T) ve rs2735572 (C/T) bölgeleri anlamlı bir şekilde kontrol grubuna göre daha yüksek bulundu. Yine diyabetik nöropatisiz hastalarda da MnSOD geninin rs73802622 (C/T), rs5746106 (T/C) ve rs5746104 (G/C) bölgelerinde anlamlılık bulundu ($p<0,05$).

Araştırmamızla ilk defa Türkiye toplumunda sayısallaştırılmış duyu testiyle diyabete bağlı nöropatik yatkınlık aranıp diyabet ve diyabetik nöropatili hastardaki antioksidan genlerin varyantlarına bakıldı.

Anahtar Kelimeler: Diyabet, nöropati, QST, antioksidan genler, polimorfizm

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi, ÖNAP projesi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 17429

ABSTRACT

Işıklı A. The Effects of Mitochondrial Genes Polymorphisms on the Progression of Subclinical Polyneuropathy in Diabetes Mellitus, İstanbul University Health Science Institute, Neuroscince Department, İstanbul 2015

Diabetes Mellitus (DM) is one of the most common life-threatening diseases and affects many tissues as well as neurons inducing polyneuropathy. Diabetic polyneuropathy (DPN) causes pain, neuronal degeneration, loss of sense of touch and sensorial disfunctioning of hands and lower limbs. Moreover, mitochondrial deficiencies are known to be associated with DPN as with many other diseases.

In our study, in an attempt to investigate the effects of neuropathy on different modalities of the touch sense, 18 patients with type 2 DM without neuropathy, 10 patients with DPN diagnosed according to International Diabetic Neuropathy pain scale 4, and 31 healthy controls were analyzed by Quantitative Sensory Testing (QST) that determines the susceptibility to small and large fiber neuropathy. In addition, we have investigated the polymorphic variants of SOD2, UCP1, UCP2, UCP3, SIRT1, SIRT3 and SIRT4 genes.

We found that patients with DM had abnormally elevated QST values. Our results have also shown that diabetic neuropathy decreases the sensorial sensitivity on hands and lower limbs. Moreover, we have found significantly altered proportions of UCP2 rs760207(G/C), rs2632725(A/T) and rs2735572(C/T) polymorphisms in the entire DM cohort ($p < 0.05$). Additionally, the frequencies of MnSOD rs73802622(C/T), rs5746106(T/C) and rs5746104(G/C) polymorphisms were significantly altered in DM patients without neuropathy ($p < 0.05$).

This is the first study that has investigated the relationship between DM by means of QST assessment and antioxidant polymorphisms in Turkish DM patients.

Key Words: Diabetes, Neuropathy, QST, Antioxytant Genes, Polymorphism

The present work was supported by Istanbul Un. Scientific Reaearch Department, Project N: 17429

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Diabetes mellitus (DM) toplumda en sık rastlanan kronik hastalıkların başında gelmektedir. Dünya genelinde %8,3 oranında görülen hastalık yaşla orantılı olarak hızla artmaktadır (46). Diyabet prevalansı ülkeler arasında ve farklı etnik gruplarda belirgin düzeyde farklılık göstermektedir, bunun sebebi ise büyük olasılıkla genetik ve çevresel faktörlerin diyabet gelişiminde büyük rol oynamasıdır.

Diyabetik hastalarda periferik nöropati çok sık rastlanan bir komplikasyondur. Sinir disfonksiyonunun patogenezinde metabolik faktörlerin ve hipergliseminin rolü saptanmış fakat hangi basamakta etkili olduğu tam olarak anlaşılamamıştır. Metabolik faktörlere bağlı aksonal disfonksiyon, Na/K-ATPaz aktivitesinde artma, anaerobik glikolizde azalma, polyollerin birikmesi, protein glikasyonunda azalma, miyoinozitol miktarındaki artma ve mikroanjiyopatiye bağlı sinir iskemisi gibi nedenlere bağlanmaktadır (12).

Klinik olarak daha çok alt ekstemitede duysal şikayetlerin olduğu eldiven çorap tarzı nöropati saptanır ve elektrofizyolojik olarak da ortaya konur. Subklinik olgularda yapılan elektrofizyolojik çalışmalarda da aynı şekilde sinir ileti hızlarında patoloji saptanabilir.

Diyabetik polinöropati (DPN) ile ilgili çalışmalar göstermiştir ki en duyarlı objektif, güvenilir ve non invazif tetkik sinir ileti çalışmalarıdır. Sinir ileti çalışmaları sadece anormalliğin derecesini değil aynı zamanda genel olarak klinik gidişteki değişimleri ve ilaç etkinliğini belirlemek içinde kullanılır. Sinir ileti parametreleri içinde F–dalga latansı en duyarlı olanıdır. Çok sayıda çalışmada (6,8,9), glisemi kontrolu iyi olan olgu grupları ile glisemi kontrolu iyi olmayan hasta grupları karşılaştırılmış ve glisemi kontrolu iyi olmayan hastalarda diyabetin komplikasyonu olarak gelişen polinöropatinin daha sık olduğu belirlenmiştir.

Diyabetin hücresel fizyolojisine baktığımızda ise hiperglisemide antioksidanların eksikliği veya antioksidanlarla etkisiz hale getirilemiyecek kadar fazla reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi oksidatif strese yol açmaktadır. Oksidatif stres hem

mitokondriyal bozukluklara neden olur hem de mitokondrial bozukluklar sonucu oluşabilmektedir. Mitokondriyal bozukluklar birçok hastalıklarla ilişkilendirildiği gibi diyabetik nöropati (DN)'de de rolleri olabileceği iddia edilmektedir.

Tüm bu bilgiler ışığında diyabetin tetiklediği polinöropatinin sıcaklık, titreşim ve soğukluk duyularına olan etkisini sayısallaştırılmış duyu testi (QST) kullanarak gözlemleme amaçlandı. İlave olarak, mitokondriyal bozukluklarla ilişkisi olabilecek mitokondriyal Mangan Süperoksit Dismutaz (MnSOD), Eşleme Bozucu Protein-1-2-3 (UCP-1, UCP-2, UCP-3), Sirtuinler (Sirt-1, Sirt-3, Sirt-4) gibi antioksidanların genetik varyantlarının DN'deki rollerini; diyabete bağlı olarak olası mitokondriyal bozuklukların kalın lif polinöropatisinin yanında, ince lif polinöropatisi ile ilişkisinin araştırılması hedeflendi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Diabetes Mellitus (DM) tanımı

Diabetes mellitus (DM), genetik kökenli, klinik tablo ve patogenez açısından büyük farklılık gösteren, yüksek kan şekeri özelliğine sahip pek çok bozukluğu ifade eden, insülinin yokluğu veya rölatif yetmezliği ile karakterize kronik seyirli metabolik hastalıktır. Dünya genelinde prevalansı %8,3 (Uluslararası Diyabet Federasyonu, IDF) iken bu oran yaşla beraber artmaktadır (45). Genetik ve çevresel faktörlerden dolayı farklı toplumlarda prevalansı değişkenlik göstermektedir (1-2).

DM tanısı klinik bulgular ve laboratuar bulgularına dayanır. Klinik bulgular: Kilo kaybı, poliüri, polidipsi, polifaji, kas güçsüzlüğü, yorgunluktur; laboratuvar bulguları: Hiperglisemi, glikozüri ve yüksek glikozile hemoglobin (HbA1c) dir. Laboratuvar testlerinden hiperglisemi ve glikozüri anlık değerleri gösterirken, HbA1c daha uzun (2-5hafta) bir periyottaki değişiklikleri ifade eder (1-3).

2.1.1. Diabetes Mellitus'un Tanı Kriterleri

Amerikan Diyabet Cemiyeti (American Diabetes Association, ADA)'nin üye olarak bulunduğu Diyabet Uzmanlar Komitesi diyabet tanı kriterlerini 1997'de revize ederek yeniden yayınladı.Yeni kriterlerde eskisinden farklı olarak açlık plazma glukozu 140 mg/dl'den 126 mg/dl'ye düşürülmüştür (5).

Tablo 2. 1. Diabetes Mellitus'un Tanı Kriterleri (ADA 1997-2008)

1. Diyabet semptomları * ile birlikte rastgele plazma glukoz düzeyinin 200 ≥mg/dl olması

veya

2. Açlık plazma glukozunun >126 mg/dl olması

veya

3. Oral glukoz tolerans testi (OGTT) esnasında 2.saat plazma glukoz değerinin 200 mg/dl veya üzerinde bulunması

veya

4. HbA1c ≥ %6,5 olması

*Diyabet semptomları arasında poliüri, polidipsi, glukozüri ve ketonüri ile birlikte açıklanamayan ağırlık kaybı sayılmaktadır.

2.1.2. Diabetes Mellitus'un Komplikasyonları

Hastalığın seyri sırasında gerek hastalığın temel özelliklerinden olan hiperglisemi ve birtakım kimyasal reaksiyonlar sonucu oluşan toksik maddelere, gerekse tedavinin yan etkilerine bağlı olarak akut ve kronik komplikasyonlar gelişmektedir (1).

Akut komplikasyonlar:

• Ketotik hiperglisemik koma

• Non-ketotik hiperglisemik koma

• Hipoglisemi

Kronik komplikasyonlar:

• Makroanjiyopati

a. Koroner arter hastalığı

b. İnme

c. Amputasyon

• Mikroanjiyopati

a. Retinopati

b. Nefropati

c. **Nöropati**

2.2.Diyabetik Nöropati

2.2.1.Tanım ve Tanısı

Diyabetin en sık görülen komplikasyonlarından biri olan diabetik nöropati (DN) periferik sinir sistemini etkileyen heterojen bir hastalık grubudur (14). En yaygın rastlanan tipi distal simetrik polinöropatidir (14,21,31,33). Küçük ve büyük çaplı duyu liflerinde kayıp nedeniyle duyusal hasarlar daha belirgindir. Küçük çaplı lif kaybı ağrı ve ısı duyusunda azalmaya neden olarak ayak ülserlerine yol açabilir. Büyük lif kaybı ise, vibrasyon duyusu ve derin duyuda azalmalar ve sinir iletim hızında yavaşlamaya neden olur (14). Diyabetik periferik sinirde görülen en önemli yapısal değişiklikler hücre dışı matriks birikimi (31), akson dejenerasyonunu takiben dairesel bazal membran tüplerinin oluşumu (15), akson atrofisi, demiyelinizasyon ve sinir lifi kaybıdır (33,18).

Diabetes mellitus gelişmiş batı ülkelerinde periferik nöropatilerin en sık nedenidir. Diyabetle birlikte yaşama süresi uzadıkça nöropati prevalansı artar. Yirmibeş yıllık diyabeti olan hastaların yaklaşık yarısında diyabetik nöropati gelişir (13).
Diyabetik nöropatilerin farklı klinik görünümleri Tablo 2.2'de verilmiştir.

Tablo 2.2. Diyabetik nöropatiler (13)

Simetrik

- Diyabetik polinöropati (DPN)
- Diyabetik otonom nöropati
- Ağrılı distal nöropati ve kilo kaybı (diyabetik kaşeksi)
- İnsülin nevriti
- Ketoasidoz sonrası polinöropati
- Glukoz tolerans bozukluğunda polinöropati*
- Diyabette ; Kronik inflamatuvar demyelinizan polinöropati (CIDP)*

Asimetrik

- Radikülopleksus nöropatileri (DRPN)
  - Lumbosakral (DLRPN)
  - Torakal
  - Servikal
- Mononöropatiler
  - Bilekte mediyan nöropati (karpal tünel sendromu)
  - Dirsekte ulnar nöropati
  - Fibula başında peroneal nöropati*
- Kranyal nöropatiler

*: Kuşkulu durum

Hiperglisemik Nöropati

Yeni tanı konmuş veya iyi kontrol altında olmayan diyabetik nöropatilerde görülür. Alt ekstremite distallerinde rahatsızlık verici dizesteziler ve ağrılarla seyreder. Gliseminin kontrol altına alınması ile hızlı şekilde düzelir. Elektrofizyolojik incelemelerde yavaş bulunan sinir iletim hızları da hipergliseminin düzelmesini izleyerek hızla normale döner (13).

2.2.2. Diyabetik Polinöropati (DPN, Distal Simetrik Polinöropati)

En sık görülen diyabetik nöropati şeklidir. Genellikle uzun süre hiperglisemiye maruz kalmış, retinopati ve nefropati gibi diğer komplikasyonları da ortaya çıkmış olan tip 1 ve tip 2 DM'li hastalarda görülür. Bir çok kere tip 2 DM'nin ortaya çıkış zamanı kesin olarak bilinemediğinden hastalığın ilk klinik bulgusu olarak da karşımıza çıkabilir. Ekstremite distallerinde yanma, batma ya da sızlama şeklinde ağrılar, paresteziler, hipoesteziden oluşan duyusal belirti ve bulgulara otonom sinir sistemi tutulmasına ilişkin bulgular ve hafif derecede distal motor zaaf ve atrofi eklenir. Yakınmalar alt ekstremite distallerinden başlayarak sinsi şekilde proksimale doğru yayılır. Üst ekstremitelere ilişkin yakınmalar genellikle distal simetrik polinöropatiye değil, karpal tünel sendromu gibi bir mononöropatiye bağlıdır (aşağıya bakınız). Şiddetli ağrı, genellikle sanılanın aksine, DPN'de sık bir belirti değildir. Subakut başlangıçlı şiddetli ağrı daha çok kilo kaybı ile birlikte olan ağrılı distal nöropati veya radikülopleksus nöropatisinde görülür (13).

Hafif *otonom* tutulma hem tip 1 hem tip 2 DM olgularında görülür. Şiddetli otonom nöropatiye ise hemen sadece tip 1 DM'de rastlanır. Başlıca belirtiler cinsel fonksiyon bozukluğu, gastroparezi, diyabetik diyare, mesane atonisi, ayaklarda terleme kaybı ve çeşitli kardiyovasküler bozukluklardır. Hastaların bir kısmında ayağa kalkınca baş dönmesi ya da senkop gibi postural hipotansiyon belirtileri vardır. Anormal kalp ritmi değişkenliği ve buna bağlı kardiyak aritmilerin diyabetik hastaların uzun vadeli sağkalım oranlarını azaltan önemli faktörlerden olduğu düşünülür. DM'li olgulardaki ani kardiyak ölümlerden diyabetik otonom nöropati sorumlu tutulmuş olmakla birlikte, yakın zamandaki bir prospektif çalışma aterosklerotik kalp hastalığı ve nefropatinin bunlarla daha fazla korelasyon gösterdiğini ortaya koymuştur (13).

Ön planda miyelinsiz ve ince miyelinli sinir liflerini etkileyen DPN yerleştiğinde büyük oranda geriye dönüşsüzdür. Klinik tabloya ayak ülserleri ve nöropatik artropati *(Charcot eklemi)* eklenebilir. Elektrofizyolojik incelemelerde genellikle aksonal hasarla seyreden duyusal-motor bir polinöropatiyi yansıtan bulgular saptanır. Ön planda ince sinir lifleri tutulan erken dönem hastalarında sinir iletim incelemeleri normal bulunabilir.

DPN tanısı, uzun süreli kötü glisemik kontrole maruz kalan ve genellikle diğer DM komplikasyonları olan hastalarda duyusal baskın distal simetrik aksonal polinöropatinin varlığında, benzer bir polinöropatiyi oluşturacak diğer nedenlerin de dışlanmasıyla konulur. Ayırıcı tanıda değerlendirilmesi gereken diğer polinöropatiler arasında amiloid nöropatisi, herediter nöropatiler, immun kökenli nöropatiler (Sjögren sendromu, paraproteinemi ile birlikte olanlar), B vitamini yetersizliklerine bağlı olanlar, hipotiroidi, üremik nöropati, vb. sayılabilir (13).

2.2.2.1.Akut Ağrılı Diyabetik Nöropati

Bu nadir görülen sendrom diyabetik duyusal polinöropatinin farklı bir formunu oluşturur. Özellikle alt ekstremitelerde, çok nadir olarak üst ekstremiteler ve gövde üzerinde akut ya da subakut başlangıçlı, geceleri belirgin, yanıcı, sızlayıcı ağrı ile karakterizedir. Buna deride yaygın kontakt hiperestezisi eşlik eder. DM'nin süre ve şiddeti ile bağıntısız olan, bazen sıkı glisemi kontrolünü izleyerek ortaya çıkan bu tabloya şiddetli ve hızlı kilo kaybı, depresyon ve impotans eşlik edebilir. Objektif nörolojik bulgu çok azdır. Tedavisi çok iyi glisemi kontrolü ile olur (tedavi ile presipite olan olgularda bile). Monofazik seyir gösterir ve genellikle 6-9 aylık bir süre içerisinde iyileşme görülür.

2.2.2.2.Ketoasidozla Birlikte Polinöropati

Diyabetik ketoasitozun başlıca belirtileri merkez sinir sisteminden kaynaklanır. Bununla birlikte, ketoasidozla birlikte alt motor nöron ve kranyal sinir tutulmaları olabilir. Akut başlangıçlı, motor baskın bir polinöropati söz konusudur. Ketoasidozun hızlı tanı ve tedavisi ile hemen ya da haftalar içerisinde düzelme gösterir(11).

2.2.2.3.Glikoz Tolerans Bozukluğunda Polinöropati

Kontrolsüz çalışmalar bozulmuş glukoz tolerans (IGT) olan kişilerde idyopatik aksonal polinöropati oranının genel toplumdan daha yüksek olduğunu göstermiş, fakat bu bulgu kontrollü çalışmalarla doğrulanamamıştır. Söz konusu polinöropatinin distal belirti ve bulguları baskın, uzunluğa bağımlı hafif bir aksonal polinöropati şeklinde seyrettiği, bu özellikleri ile DPN'nin hafif bir formunu teşkil ettiği düşünülmektedir (13).

Diyabette Kronik inflamatuvar demyelinizan polinöropati (CIDP)

Bazı yazarlar diyabetlilerde CIDP sıklığının genel topluma oranla yüksek olduğunu öne sürmüşlerdir. Bununla birlikte, özellikle DM'nin toplumda sık rastlanan bir hastalık olması nedeniye, bu iki hastalık arasında tesadüfün ötesinde bir ilişki bulunduğu kanıtlanamamıştır. Yine de, bazı diyabetik nöropati formları ile CIDP arasında, Beyin-Omurilik Sıvısı (BOS)'ta protein artışı, sinir iletimlerinde demiyelinizan özellikler ve immunmodulatuvar tedaviden yararlanma gibi ortak özellikler bulunması ilgi çekicidir. DM'lu bir hastada ortaya çıkan polinöropatinin hızlı ve motor belirtileri baskın ağır bir seyir göstermesi, muayenede tendon reflekslerinde genel azalma bulunması, sinir iletim incelemelerinde multifokal demiyelinizasyonun açık bulgularının saptanması ve BOS proteininin çok yüksek olması halinde CIDP varlığı düşünülerek tedavinin ona uygun şekilde planlanması yerinde olur (27).

2.2.3. Mononöropatiler

2.2.3.1.Kranyal Nöropatiler: Akut başlangıçlı 3. ve 6. sinir felçleri genellikle ileri yaşta, glisemi kontrolü kötü olan hastalarda ortaya çıkar. Olguların yarısı kadarında göz çevresi ve ardında şiddetli ağrı ile başlar. Aylar içinde spontan ve tam düzelme gösterir (13). Diyabetik 3. sinir felcine genellikle pupilla katılmaz. Bunun nedeni, sinirin orta kesimindeki muhtemelen iskemik kökenli lezyondan sinirin periferindeki otonom liflerin etkilenmemesidir. Bazı diyabetik olguların akut başlangıçlı izole kranyal sinir felçlerinden beyinsapındaki küçük iskemik lezyonların sorumlu olduğu da gösterilmiştir (12).

Diyabetik hastalarda 7. sinir felcinin de daha sık görüldüğü iddia edilmiştir. Ancak diyabet ve Bell felci toplumda sık görülmektedir ve bu iki hastalık durumu arasında nedensel bir bağlantı olduğuna ilişkin kanıtlar yoktur. Diyabetik bir hastada gelişen periferik yüz felcinin bir diyabetik nöropati formu olarak değil Bell felcinde (ya da bu sinirin diğer lezyonlarında) olduğu şekilde ele alınması uygun olur (Bakınız: Kranyal Nöropatiler). Bazı yazarlar DM varlığının Bell felcinin iyileşmesi açısından kötü bir prognostik faktör olduğunu öne sürmüştür .

2.2.3.2.Tuzak Nöropatileri: Diyabetik polinöropati, tuzak nöropatilerinin oluşumunu kolaylaştırabilir. Subklinik diyabetik polinöropatisi olan bir hasta, en sık görülen tuzak

nöropatisi olan karpal tünel sendromuna ait klinik yakınmalarla hekimin karşısına çıkabilir. Hastanın yakınma ve bulgularının şiddeti tuzak nöropatisine yönelik özgün tedavileri (cerrahi girişim gibi) gerektirecek düzeye varabilir. Bazı hastalarda ise tuzak nöropatisinin belirti ve bulguları olmaksızın elektrofizyoljik incelemelerde sinirlerin mutad tuzaklanma yerlerinde (en sık olarak bilekte mediyan, dirsekte ulnar sinir) iletim yavaşlamaları saptanır (subklinik tuzak nöropatisi).

2.3. Diyabetik Polinöropati Patogenezi

Tablo 2.2' de görüldüğü gibi diyabetik nöropati formlarını genel olarak distal-simetrik (duyusal-otonom-motor) ve fokal-multifokal (proksimal asimetrik, lumbosakral-trunkal-kranyal) nöropatiler olarak iki gruba ayırmak mümkündür. Distal-simetrik polinöropatilerin oluşumuna daha çok diyabete bağlı sinir metabolizması bozukluğunun neden olduğu, proksimal-asimetrik formların ise diyabetik küçük damar hastalığına bağlı olarak ortaya çıktığı düşünülmektedir. Tüm diyabetik nöropati formlarını tek hipotezle açıklamaya çalışan görüşler de vardır. Örneğin, diyabetik küçük damar hastalığına bağlı multifokal çok sayıda lezyona ait belirtilerin bir araya toplanarak (konflüans göstererek) bir distal simetrik polinöropati görünümü ortaya çıkarabileceği de savunulmaktadır. **Tablo 2.3.** DM'lu hastalarda görülen farklı nöropati tabloları için en olası patogenetik mekanizmaları özetlemektedir.

Tablo 2.3. Diyabetik nöropatilerin fizyopatolojik sınıflaması (13)

Fizyopatolojik mekanizma	Nöropati alt-tipi
Metabolik-mikrovasküler-hipoksik	Diyabetik polinöropati (DPN)
	Diyabetik otonom nöropati
Inflamatuvar-immun	Radikülopleksus nöropatileri (DRPN)
	Kranyal nöropatiler
	Ağrılı distal nöropati ve kilo kaybı (diyabetik kaşeksi)
	Diyabette CIDP
Kompresyon ve tekrarlayıcı hasar	Bilekte mediyan nöropati
	Dirsekte ulnar nöropati
	Fibula başında peroneal nöropati
Diyabet komplikasyonları	Ketoasidoz nöropatisi
	Kronik böbrek yetersizliği nöropatisi
	Büyük damar iskemisi ile birlikte nöropati
Tedavi ile ilişkili	İnsülin nevriti
	Hiperinsülin nöropatisi

2.3.1. Metabolik mekanizmalar*:* "Diabetes Control and Complications Trial" (DCCT) isimli klinik çalışma kan şekerini çok sıkı şekilde kontrol altına alan yoğun insülin tedavisinin diyabetik nöropati gelişme riskini 5 yılda % 64 oranında azalttığını göstermiştir (46). Bu bulgu, yüksek kan glukozunun yol açtığı metabolik bozuklukların diyabetik nöropatiye yol açabileceğine ilişkin en kuvvetli kanıtı teşkil etmektedir. Kronik hiperglisemi lipid, alkol şekerleri ve miyoinozitol metabolizmasında bozukluklara yol açar . Üzerinde en çok durulan ve çalışılan metabolik hipotez, *poliyol yolu* ile ilgili olandır. Glikoz, aldoz redüktaz enzimi tarafından sorbitole dönüştürülür. Hiperglisemi nedeniyle bu metabolik yolun aşırı çalışması hücre içinde *sorbitol*

*birikimi*ne yol açar. Bu birikim hücre içinde miyoinozitol ve taurinin azalmasına, bu da hücre metabolizmasının bozulmasına neden olur. Hücre içinde miyoinozitol ve taurin azalmasının Na^+-K^+-ATPaz aktivitesi azalmasına ve sinir iletim hızının düşmesine neden olduğu gösterilmiştir. Aldoz redüktaz inhibitörleri uygulaması ve diyete miyoinozitol eklenmesi ile diyabetik nöropatiyi tedavi etmeyi amaçlayan çalışmalardan bugüne kadar yüz güldürücü ve kliniğe uygulanabilecek sonuç alınamamıştır. Bununla birlikte, farklı ilaçlarla yapılacak yeni çalışmalardan daha olumlu sonuçlar alınması beklenebilir (12).

Nörotrofik faktörlere ilişkin bozuklukların diyabetik nöropatiden sorumlu olabileceğine ilişkin bulgular da elde edilmiştir. Hayvan deneylerinde ve diyabetik hastalar üzerindeki çalışmalarda sinir büyüme faktörü (NGF) düzeyinin azaldığı ve hedef dokulardan sinir hücre gövdesine retrograd aksonal transportunun bozulduğu gösterilmiştir (6). Başka bir çalışmada diyabetik hastaların derisinde NGF ekspresyonunun azalması ile ince lif nöropatisinin başlangıç bulguları arasında bir korelasyon olduğu görülmüştür. Diğer bazı çalışmalarda nörotrofin-3 ve insüline benzer büyüme faktörü azalımı ile diyabetik nöropati arasında ilişki bulunmuştur. Nörotrofik faktörlerle nöropatilerin önlenmesi ve tedavisini amaçlayan preklinik araştırmalar olumlu sonuçlar vermekle birlikte, bugüne kadar yapılan klinik çalışmalarda birbiri ile uyumsuz sonuçlar elde edilmiştir (13).

2.3.2.Vasküler mekanizmalar: Özellikle fokal/asimetrik diyabetik nöropatilerin oluşumundan sorumlu tutulan vasküler mekanizmalara ilişkin en önemli kanıtlar klinik ve histopatolojik verilerden kaynaklanmaktadır. Gerçekten de, multifokal seyirli nöropatilerin en önemli nedenlerinden birisi sinirleri besleyen küçük damarların hastalığıdır.Histopatolojik olarak diyabetik mikroanjiopatide damar duvarlarında kalınlaşma ve endonöral küçük damar lümenlerinde daralma görülür. Bu patolojik sürecin başlıca bileşenleri bazal lamina duplikasyonu, endotel ve perisit hücrelerinin dejenerasyonu, endoteliyal fenestrasyon ve ayrışmadır. Diyabetik lumbosakral radikülopleksopatisi olan hastaların sinir biyopsilerinde mikroanjiopatiye sekonder iskemik değişikliklerin varlığı gösterilmiştir (aksonal dejenerasyon, multifokal sinir lifi kaybı, fokal perinöral fibroz ve kalınlaşma, hasar nöromaları, neovaskülarizasyon ve organellerin biriktiği şiş sinir liflerinin varlığı). Mikrovasküler hasarın sinir liflerinde

aksonal hasarın yanısıra akson distrofisine bağlı sekonder segmental demiyelinizasyona da neden olduğu görülmüştür (13).

Vasküler hipotezle metabolik görüşleri ve yaygın polinöropati oluşum mekanizmasını bağdaştıran yorumlar da vardır. Endonöral hipoksinin sinir liflerinde aksonal transportu ve Na^+-K^+-ATPaz aktivitesini azalttığı düşünülür. Bu bozukluklar da aksonal atrofiye ve sonuçta sinir iletim hızının yavaşlamasına neden olur (31).

Diyabetik nöropatinin gelişiminde *otoimmun mekanizmalar*ın rolü konusundaki görüşler nöropatinin tedavisinde yeni yaklaşımların tartışılmaya başlamasına neden olmuştur. Özellikle diyabetik radikülopleksus nöropatisi olan hastaların sinir biyopsilerinde mikroskopik vaskülit varlığını (epinöral küçük damarların duvar ve çevrelerinde inflamasyon, damar duvarında nekroz ve eski kanama bulguları) gösteren çok sayıda çalışma vardır. Bu bulgular, özellikle fokal/asimetrik diyabetik nöropatilerin tedavisinde kortikosteroidler ve intravenöz immunglobulin (IVIg) gibi immunomodülatuvar tedavilerin uygulanmasını gündeme getirmiştir. Kendiliğinden regresyon gösterme eğilimi olan bu nöropatilerde uygulanan immunmodülatuvar tedavilerin etkili olup olmadığı tartışılmakla birlikte, bu tedaviler bir çok merkezde ağır seyirli ve yeterli düzelme göstermeyen olgular üzerinde denenmektedir. Çok merkezli, prospektif, kontrollü bir çalışma çalışma ile IV metilprednizolon uygulamasının ağrı ve diğer duyusal belirtiler gibi ikincil sonlanım kriterleri üzerine etkili olduğu, erken uygulanması halinde DLRPN olgularında yararlı olabileceği kanısına varılmıştır. Kortikosteroid uygulamasının,glisemi kontrolünü kötüleştirme potansiyeli göz önünde bulduarak- hastanın diyabetoloğunun yakın kontrolü altında yapılması gerekir (33).

2.3.3. Diyabetik Polinöropatinin Saptanması

Diyabetik hastalarda makroanjiyopati, albümin ekstresyon oranı, ve HbA1c düzeyi kontrol altına alınmış olsa bile nöropatisi olan hastalarda mortalite oranı anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Diyabetik nöropatinin varlığının saptanmasında klinik semptomlar, nörolojik muayene, elektrofizyolojik testler, kantitatif duyu testleri (QST) ve otonomi fonksiyon testleri (AFT)'nin her birinden en az bir ölçüm önerilmektedir (2). Diyabetik nöropatili hastalar özellikle alt ekstremite distallerinde duysal yakınmalar ile hekime başvururlar. Genellikle yapılan nörolojik muayenede eldiven çorap tarzı

duyu kusuru, hiporefleksi veya arefleksi, vibrasyon duyusu algı eşiğinde yükselme, özellikle ayak intrensik kaslarında ılımlı atrofi ve zaaf saptanır (4).

2.3.3.1. Elektrofizyoloji: Motor sinir iletimi, duysal sinir iletimi, iğne EMG'si, geç yanıtlar, spinal uyarılmış potansiyeller incelemelerini içerir.

2.3.3.2. Kantitatif Duyu Testleri: Bunlar dokunma basıncı, vibrasyon, soğuk-sıcak duyusu, ısı ağrısı, soğuk ağrısı ve mekanik ağrıyı saptama eşikleridir (24). Bir cihaz yardımı ile hastaya sunulan vibrasyon, sıcak ve soğuk uyaranlarına ilişkin duyum eşiklerinin çeşitli bilgisayar algoritmaları kullanılarak belirlenmesi ve sayısallaştırılmasını amaçlayan bir yöntemdir. Kalın miyelinli liflerin fonksiyonları vibrasyon tanıma eşiği ile incelenirken, ince sinir lifleri soğuk, sıcak, soğuk ağrısı ve sıcak ağrısı tanıma eşikleri ile araştırılır. Özellikle objektif klinik ve elektrofizyolojik bulguları olmayan ağrılı ince lif nöropatisi olgularında C ve A liflerinin fonksiyon bozukluklarının ortaya konmasında önem taşır. Tanıda olduğu kadar tedavinin etkilerini takipte de yararlı olabilir. Bu yöntemle ilgili sorunlar, özel cihaz gerektirmesi, zaman alıcı oluşu ve tek tek hastaların incelenmesinde anormal sonuç verme yönünde bir eğilimi olmasıdır. Şimdilik klinik tanı amacı için yaygın hale gelmemiş olan bu yöntem epidemiyoloji ve tedavi çalışmalarında kullanılacak düzeye erişmiştir (13).

2.3.3.3. Otonomi Fonksiyon Testleri: Bunlar vasomotor kontrol, baroreseptör refleksler, sudomotor fonksiyon, pupil, mesane ve barsak innervasyonu ile ilgili testlerdir. Hastalarda nöropatinin evrelemesi ve klinik takibi amacı ile değişik skorlamalar yapılmıştır. Dyck ve arkadaşlarının önerdiği Nöropati Semptom Skorlaması (NSS) ve Nöropati Engelilik Skorlaması (NDS) en sık kullanılanlarıdır (11). Muayenenin yanı sıra laboratuar testlerininde katıldığı Cornblath ve arkadaşlarının yaptığı Total Nöropati Skorlaması (TNS) ise en kapsamlılardandır. TNS semptomların ve bulguların derecelendirilmesinden, sinir ileti çalışmalarından ve QST'den elde edilen bilgileri birleştirir, periferik nöropatiyi tespit etmede ve kantitifiye etmede kolay uygulanabilen ve geniş kapsamlı bir ölçüm sağlar. Diyabetik nöropatili 30 olgu ile yapılan bir çalışmada TNS ile NDS ve NSS'nin korele olduğu bulunmuştur. Olgulardaki tutulum distal aksonal nöropati ile ilgili olduğundan, olguların duyusal ve motor semptomları özellikle ekstremitelerin distallerinde sorgulanmaktadır ki bu da NDS ve NSS'ye olan üstünlüğünü oluşturmaktadır
(11).

2.4. Diyabetik Polinöropatinin Moleküler Patogenezi

Diyabetik nöropati patogenezi tam olarak anlaşılamamasına rağmen, artmış aldoz redüktaz aktivitesi, azalmış nörotrofik destek, artmış reaktif oksijen türleri (ROS) ve proteinlerin enzimatik olmayan glikozilasyonu gibi faktörlerin diyabetin patogenezinde rol oynadığı öne sürülmektedir (14,33). Kronik hiperglisemi, insülin ve C-peptid eksiklikleri pek çok mikrovasküler komplikasyonu başlatan etkenlerdendir (24,25,27). Glukozun oto oksidasyonu sonucu oluşan ROS damar geçirgenliğini arttırarak endotel hasarı yapabilir (18,29). Diabetik nöropatinin gelişimine neden olan ROS'un kaynağı mitokondridir. Mitokondri sadece ROS'un kaynağı değil aynı zamanda ROS'un hedefidir. ROS'un mitokondriyal DNA ve proteinleri ile reaksiyona girip hastalıklara neden olarak bozukluklara yol açtığı düşünülmektedir. Mitokondrial bozuklukların diabetik nöropatinin patolojisinde de önemli rol oynadığı kabul edilmektedır. Brownlee de mitokondriye bağlı işlemlerin diabetin komplikasyonlarının gelişiminde oksidatif stresin rol oynadığını iddia edilmektedir. Mitokondriyal bozukluklara sebep olan oksidatif stres ROS üretimin artması veya ROS'u etkisiz hale getiren antioksidanların yetersizliği sonucu oluşmaktadır. Mitokondriyal bozukluklar endotel hücre, kardiomiyosit ve nöronlarda diyabetin komplikasyonlarının gelişimine aracılık etmektedir. Dorsal kök ganglion hücreleri (DRG), Schwann hücreleri ve insan nöroblastoma hücrelerinde yüksek konsantrasyonlarda glukozun mitokondriyal ROS ve mitokondriyal membran potansiyelinde artışına yol açtığı görülmüştür. Periferik sinirlerde DRG'nun dejenere olduğu ve DRG'deki mitokondrilerin özellikle etkilendiği görülmüştür. Bu da hiperglisemik nöronlarda DRG mitokondrilerinin ROS üretiminin kaynağı olmasıyla açıklanmaktadır. Çok miktarda bulgu nöral mitokondrilerdeki DNA, iç ve dış membranların, mitokondrilerin sayı ve şeklini kontrol eden fizyon ve füzyon proteinlerinin, elektron transport zincirinde (ETZ) rol oynayan enzim ve proteinlerin ROS'un oluşturduğu hasara maruz kaldığını göstermektedir (29). Gerek mikroarray gerekse proteomik çalışmaları diabetin mitokondrideki solunum zincir fonksiyonlarını azalttığını göstermiştir. Hiperglisemi koşullarında mitokondrideki ETZ'de görev yapan komplekslerin aktiviteleri azalmaktadır. Her ne kadar kompleks I ve kompleks III oksidatif stresten en çok etkilenen enzimler olsa da diğer komplekslerin de oksidatif stresten etkilendiğine dair pek çok çalışma bulunmaktadır. Uzun süre hiperglisemiye maruz kalan sinir dokularında mitokondriyal kompleks ve sitrat sentaz aktivitesinde ciddi azalmalar kaydedilmiştir. Buna karşılık endotel hücrelerinde glukozun indüklediği

mitokondriyal ROS'un inhibe edilmesinin hiperglisemi sonucu oluşan hasarı azalttığı görülmüştür.

Organizma oksidatif stresi ortadan kaldırmak için enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar geliştirmiştir. MnSOD mitokondride oksidatif fosforilasyon yan ürünü olarak oluşan süperoksit radikalini etkisiz hale getiren mitokondrideki en önemli antioksidan enzimidir (16,28,34). Mitokondriyal MnSOD enzimi nükleer DNA (nDNA) tarafından kodlanmakta ve ürünü mitokondriye taşınmaktadır (23). MnSOD'un polimorfik varyantları MnSOD'un yapısında değişikliğe neden olur ve değişiklik bu enzimin mitokondriye girişini ve fonksiyonunu etkileyebilmektedir. MnSOD enziminin daha az çalışması sonucu, ROS'un artması ile membranlarda lipid peroksidasyon (LP) zincir reaksiyonları başlar ve membran fonksiyonlarını bozacak şekilde ilerleyebilir. Membranlarda lokalize olan birçok yapısal ve fonksiyonel protein bu olaylar zincirinden etkilenir. Özellikle taşıma ve pompa görevi yapan proteinler, LP'ya bağlı değişikliklerden etkilenerek üçüncül yapılarında değişime uğrarlar. Ayrıca üçüncül yapıları değişen membran enzimlerinin aktivitesi de bu değişikliklerden etkilenir. Bütün bu değişiklikler, membran fonksiyonlarının büyük ölçüde bozulması anlamını taşır.

Mitokondrideki uncouple proteinlerin (eşleşme bozucu, UCP) ROS düzenlemesi ve insulin sekresyonu ilişkisi nedeniyle DN alakası olabileceği düşünülmektedir. Negre-Salvayre ve arkadaşları (22), ilk olarak 1997 yılında, UCP mitokondrinin ROS düzenlenmesinde rolü olduğunu öne sürmüşlerdir. UCP mitokondri iç membranında bulunan moleküler ağırlığı 31-34 kDa arasında değişen integral membran proteinleridir. Bu proteinler mitokondri anyon taşıyıcı süper ailesinin alt kümesini oluşturmaktadır. Genomik DNA tarafından kodlanan bu proteinlerin memelilerde UCP-1, UCP-2, UCP-3, UCP-4 ve BMCP-1 (UCP-5 olarak da adlandırılmaktadır) olmak üzere beş grubu belirlenmiştir. UCP-1 geni farede 8. sıçanda 19. ve insanda ise 4. kromozom üzerinde bulunmaktadır. UCP-1 kahverengi adipoz dokusundaki eşleşmeme işleminden sorumludur. Soğuğa maruz kalmış hayvanların kahverengi adipoz dokusunda, yeni doğmuş memelilerde ve kış uykusundan uyanan hayvanlarda UCP-1 çalıştığı zaman, eşleşmemeden dolayı artmış substrat oksidasyonu ve ısı üretimi gözlenir. UCP-1 enerji harcanması ve vücut ağırlığının kontrolünden sorumludur. UCP-1 ve UCP-3 birbirleriyle yakın ilişkili oluğu gösterilmiştir. UCP'ler dokulara özgün eksprese edilmektedir. UCP ailesinin üyesi olan UCP-2 pankreas adacıklarının da dahil olduğu birçok dokuda eksprese olmaktadır. Kısacası UCP-2'nin vücut sıcaklığına, enerji

metabolizmasına ve mitokondrial ROS üretiminin düzenlemesine katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Deneysel çalışmalarda, nöral hücreler ve kardiomiyositlerde oksidatif stresin indüklediği hücre ölümlerine karşı UCP aktivasyonunun koruyucu etkileri kayıtedilmiştir. UCP-2'nın insulin sekresyonunu düzenlediğini destekleyen rolü UCP knockout farelerinde de gösterilmiştir. Gen haritalama çalışmaları insanda UCP-2 geninin UCP-3 geninden çok uzakta olmadığını göstermiştir ki; bu bulgu bu genlerin muhtemelen gen duplikasyonu sonucu oluştuğunu düşündürmektedir. Bu gen kümesi 11q13 kromozomunun kısa kolu üzerinde bulunmaktadır. Mitokondrideki ROS ETZ aracılığıyla iç membrana karşı oluşturulan elektromotif kuvvete karşı oldukça duyarlıdır. UCP-2 ve UCP-3 aktivasyonuna sebep olan orta derecede eşleşmeme proton-motiv kuvveti hafif azaltarak ROS üretimi düşmesine yol açar ve ROS ile ilişkili hücresel hasarı önler. UCP LP'nu etkilediği gibi LP son ürünleri olan hidroksinonenal (HNE) gibi alkenler de UCP'lerin proton iletkenliğini artırır, proton-motif kuvvetini ve süperoksit üretimini azaltır (26,32).

Sirtuin 1 de (sirt 1) mitokondriyal UCP-2 ekspresyonunu inhibe etmek suretiyle beta hücrelerinde insulin sekresyonunu pozitif şekilde düzenleyerek görev yaptığı düşünülmektedir. Sirt ailesi 7 proteinden oluşmaktadır. Deasetilaz aktivitesine sahip olan Sirt 1 nukleusta yeralmakta ve histon deasetilayonu yoluyla transkripsiyonal represörü olarak görev yapmaktadır. Sirt 1'in beta hücrelerinde oksidatif stres ile de ilişkisi olabileceği düşünülmektedir. Sirt ailesinden olan sirt 3 ve sirt 4 de mitokondri matriksinde bulunmakta ve sirt 3 mitokondrial proteinlerin deasetilasyonunu yapmaktadır (19,20,30).

Hiperglisemik koşullarda mitokondriyal protein ve enzimlerin aktivitelerinin azalmasının en önemli nedenlerinden birinin bu protein ve enzimleri kodlayan genlerin mutasyona uğraması olarak tanımlanmaktadır. Diğer bir neden de farklı genlerde farklı polimorfik variantlara sahip insanların oksidatif stresi aynı şekilde tolere edememesinden kaynaklandığı gösterilmiştir. Diğer bir değişle hiperglisemik koşullarda oluşan oksidatif stres farklı kişilerde farklı sonuçlar doğurabilir ve böylece diyabetik komplikasyonların gelişimi kişilerde farklılık gösterebilir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hasta Seçimi

İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıkları ABD Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları AD Diyabet Polikliniği'nde (Diyabet Uzmanlar Komitesi 2003 kriterlerine göre) tip 2 diyabet tanısı ile takip ve tedavi görmekte olan 28 hasta ve 31 kontrol olgusu prospektif olarak çalışmaya alındı. Dışlama ve içleme kriterlerine göre iki uzman hekim tarafından seçilen hastalara yapılandırılmış sosyodemografik anket uygulandı. Çalışma öncesi hastalardan ve kontrol olgularından onay alındı, diabet komplikasyonları yönünden sorgulanarak, sosyodemografik form dolduruldu. Daha sonra kayıt altına alınmış hastalar **İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Nöroloji AD'da** DN tanısı için Uluslararası Diyabet Nöropati ağrı skalası 4 (DN4), kalın, ince ve otonomik tutulum için elektrofizyolojik incelemeler yapıldı. Diyabetik Nöropatili hasta grubu DN4 ile oluşturuldu (53,54).

3. 1.1. Çalışmaya Alınan Hasta ve Kontrol Gruplarının Özellikleri

Çalışmaya Diyabet Polikliniği'ne başvuran, çalışmaya dahil etme kriterlerini taşıyan ve çalışmaya katılmayı kabul eden 28 DM tanılı hasta ve 31 kontrol olgusu; toplamda 51 katılımcı alındı. Yapılan istatistiksel değerlendirmede bu gruplarda DN tanısı açısından sorgulandı ve kontrol grubu ile karşılaştırılması yapıldı. Çalışma motifinde seçilen hasta ve kontrol gruplarının içleme ve dışlama kriterleri şunlardır:

3.1.2.1 Hastaların çalışmaya alınma kriterleri

- Tip 2 diabetes mellitus (tanısı en az 6 ay önce konulmuş olmalı)
- 18-65 yaş arası olmalı
- Diabetes mellitus dışında, DN'ye neden olabilecek bilinen başka bir hastalığın olmaması

3.1.2.2. Hastaların çalışmaya alınmama kriterleri:

- Anamnez, fizik muayene ve gerektiğinde laboratuvar bulgularına dayanarak diabetes mellitus dışında bilinen kronik böbrek yetersizliği veya karaciğer hastalığı olanlar
- Malignitesi bulunan olgular, romatolojik hastalık tanısı alanlar, iki hafta öncesine kadar infeksiyon öyküsü olanlar

- Yoğun alkol kullanan olgular
- Herhangi bir nedenle tiroid fonksiyon bozukluğu bulunan, hormon replasman tedavisi alan hastalar
- Periferik sinir hasarı oluşturabilecek ekstremite travması geçirmiş olanlar, periferik nöropatiye neden olabilecek ilaç kullanımı olanlar ve toksik maddeye maruz kalanlar

3.1.3.Kontrol grubu olarak çalışmaya alınma kriterleri:

- Yaş hasta grubu ile uyumlu olmalı
- Bilinen dahili veya nörolojik bir hastalığının olmaması
- Kontrol grubuna dahil edilecek kişilerin, hasta grubunun seçiminde göz önünde tutulan dışlama kriterlerini karşılaması

Tablo 3.1: Hasta ve Kontrol Bilgileri

	Kontrol N (%)	DM N (%)	Diyabetik NP'li N (%)	Diyabetik NP'siz N (%)	P değeri
Cinsiyet (kadın/erkek)*	18/13 (58,1/41,9)	12/16	4/6 (40,0/60,0)	8/10 (44,4/55,6)	0,00
Yaş (yıl)	54,32±11,56	59,80±7,82	61,50±8,47	58,33±7,42	0,47
Sigara kullanımı	6(19,4)	2 (11,1)	-	2(11,1)	-
Alkol kullanımı	-	1(5,6)	-	1(5,6)	-
Hastalık süresi	-	13,96± 5,67	17,1±6,21	12,22±4,66	0,00
Tedavi şekli OAD İnsülin İnsülin+OAD	-	 9(32,1) 9(32,1) 10(35,7)	 1 (10,0) 7(70,0) 2(20,0)	 8(44,4) 2(11,1) 8(44,4)	

3.2. Biokimyasal Değerlendirme

Çalışma kapsamındaki olguların dosyaları gözden geçirilip, biokimyasal sonuçları kaydedildi. Bu aşamada İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıkları ABD. Endokrinolji ve Metabolizma Hastalıkları BD. poliklinik ve servisteki hastaların tıbbi dosyaları incelenerek biyokimyasal değerlendirmeleri kaydedildi ve hasta kabul kriterlerine göre değerelendirildi.

3.3. Elektrofizyolojik Değerlendirme

Diabetes Mellitus tanısı almış hastalar **İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Nöroloji AD'da,** DN tanısı açısından güncel kılavuzlara uygun olarak sorgulandı. Bu amaçla **Standard duyusal ve motor sinir iletim incelemeleri** tek yanlı üst ve alt ekstremitede 2 şer duyusal (nn. medianus, ulnaris, suralis, plantaris medialis) ve motor (nn. medianus, ulnaris, tibialis, peronealis) iletim incelemesi yapıldı.

İnce lif nöropatisine yönelik testler:

3.3.1. Kantitatif duyusal test ve otonom testler: İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Sinirbilim Anabilim Dalında, 17429 numaralı "Diyabetik Nöropatide Mitokondriyal Bozukluklar" başlıklı proje kapsamında alınan **Quantitative Sensory Testing (QST,** Isı-titreşim düzeneği, WR Medical Elecronics Co. Case IV-Conputer Aided Sensory Evaluater,) ve **Q-SWEAT QUANTITATIVE SWEAT MEASUREMENT SYSTEM** ile sayısallaştırılmış sıcak ve soğuk duyusu ayırt etme testleri ile otonom testler standard protokollerle gerçekleştirildi.

3.3.2. İntraepidermal uyarımla SEP kaydı. İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Nöroloji AD'da EMG/EP sistemi ile ince lif nöropatisini değerlendiren bir elektrofizyolojik test yöntemi çalışmaya eklenerek, bu yöntemle elde edilecek sonuçların QST ve otonom test sonuçları ile karşılaştırılması planlandı.

3.4. Klinik Değerlendirme

Tüm olguların ayrıntılı olarak nörolojik ve sistemik muayeneleri yapılan, nöropatiyi düşündüren subjektif yakınmalar ve objektif muayene bulgularına göre derecelendirildi. Polinöropati derecelendirmesi yüzeyel dokunma duyusu (pamukla değil, iğne ile ağrı, standart flamanlarla deri basınç), derin duyu, derin tendon refleksi (DTR) ve kas gücü muayenesine göre yapıldı. Derin duyu muayenesinde 128 Hz'lik diyapazon ile bakılan vibrasyon duyumu ile Romberg ve eklem pozisyonu duyumu dikkate alındı. Kas gücü muayenesi 5 üzerinden değerlendirilen, 5 tam kuvvet, 0 ise plejik durum olarak

yorumlandı. Diabetes mellitus hastaları Michigan DN Skorlaması nöropatik ağrı skalası ile değerlendirildi.

3.5. Çalışma Materyali

Tanımlanan deney ve kontrol gruplarındaki olgularından EDTA'lı tübe alınan venöz kan örnekleri çalışmanın materyalini oluşturdu.

EDTA'lı 2 ml kan *(mitokondriyal MnSOD, UCP-1, UCP-2, UCP-3, Sirtuinler (sirt-1, sirt-3, sirt-4*) . Genetik testler için alındı.

3.6. Genetik Metod

3.6.1. Araçlar, Aletler ve Cihazlar :

- MagNA Pure LC 2.0 DNA izolasyon robotu (Kit olarak MagNA Pure LC DNA Isolation Kit I kullanılmıştır)
- BIORAD T100 Thermal Cycler
- BIORAD PowerPac Basic elektroforez sistemi
- BIORAD Gel Doc EZ Imager görüntüleme sistemi
- Illumina MiSeq yeni nesil dizileme cihazı

3.6.2. DNA İzolasyonu ve Saklanması

İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıkları AD Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları BD Diyabet Polikliniği'ne başvuran hastalar ve gönüllü sağlıklı kişiler çalışma kritelerimize göre seçildi. Daha sonra EDTAlı kan örnekleri alınarak DNA ekstraksiyonu yapıldı. Arkasından Enstitümüzde bulunan Illimuna IScan mikroarray ile bu DNA örneklerinde mitokondrial bozukluklarla ilişkisi olabileceği tahmin edilen MnSOD, UCP-1, UCP-2, UCP-3, Sirt-1, Sirt-3, sirt-4 antioksidan genlerine ait aşağıdaki polimorfik varyantlarında mikroarray yöntemiyle genotiplendirme yapıldı.

A. Tampon Çözeltiler:

1) Eritrosit Parçalama Tamponu (Red Blood Cell Lysis Buffer, pH 7.4)

8.74 g Amonyum klorür, 10 g Potasyum bikarbonat, 2 ml 0.5 M Etilen diamin tetra asetat (EDTA) beher içine alındı. 900 ml bidistile su eklendi ve çözeltinin pH'ı 1 N NaOH ile 7.4'e ayarlandı. Çözelti ölçü balonuna aktarılarak 1 litreye tamamlandı. Hazırlanan çözelti ısıya dayanıklı cam şişeye alınarak 120 ^{0}C'de 15 dakika otoklavlanarak ve + 4^{0}C'de saklandı.

2) 2M PBS (Fosfat Tamponu)

8 g/L NaCl, 0,2 g/L KCl, tartıldı ve behere alındı. Üzerine 500 ml'ye kadar distile su eklendi. Hazırlana çözelti ısıya dayanıklı cam şişeye alınarak 120 ^{0}C'de 15 dk. otoklavlanarak sterilize edildi ve oda sıcaklığında saklandı.

3) 9.5 M Amonyum Asetat

73.22 g amonyum asetat beher içine alındı ve üzerine 80 ml bidistile su eklenerek +40^{o}C' de manyetik karıştırıcı yardımıyla çözündürüldü. Çözelti ölçü balonuna aktarılarak bidistile su ile 100 ml'ye tamamlandı ve 0.22 μm lik filtreden geçirilerek sterilize edildi. +4^{0}C'de saklandı.

4) % 10 Soyum Dodesil Sülfat (SDS, pH 7.2)

10 g SDS çok dikkatli bir şekilde (tozlarının kaldırılmaması gerekir) beher içine alındı ve üzerine 80 ml bidistile su eklenerek manyetik karıştırıcı yardımıyla iyice çözüldü. pH 7.2 NaOH ile ayarlanarak ölçü balonuna aktarıldı ve bidistile su ile 100 ml'ye tamamlandı. 0.22 μm lik filtreden geçirilerek sterilize edildi. Analiz için oda s1cakl1 1nda sakland1.

5)Tris- EDTA

2.5 mL 1M Tris (pH 8.0) ve 0.5 mL 0.5 M EDTA (pH 8.0) ölçü balonuna alındı ve bidistile su ile 250'mL'ye tamamlandı. 120 ^{o}C 'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi ve oda ısısında saklandı.

6) Etidyum Bromür (10mg/mL)

100 mg Etidyum bromür tartılarak sreil bidistile su ile 10 mL'ye tamamlandı. Bu ayıraç DNA bantlarının UV altında görünür olmasını sağlar.

7) Proteinaz K (20mg/ml)

20 mg proteinaz K steril bir ependorf içinde steril bidistile ile 1 ml'ye tamamlanarak -20^{0}C'de saklandı.

B. DNA İzolasyon İşlemi:

Hasta ve kontrollerden 2 ml'lik EDTA'lı tüplere alınan kanlar 200µl'lik tüplere aktarıldı. Üzerine 400µl (1:2 oranında) RBLB eklenerek karıştırıldı ve 15-25^{0}C aralığında 15 dakika berrak solüsyon görülene kadar bekletilti. Bekletilen örnekler 15-25^{0}C aralığında 10 dakika 700x*g'* de santrifüje edildi. Santrifüj sonrası oluşan sulu faz atıldı ve kalan homojenize pellet üzerine 1 ml RBLB eklenerek süspanse edilip Eppendorf tüpüne alındı. Örnekler 15-25^{0}C aralığında 3 dakika 600x*g'* de santrifüje edilerek süpernantant (sulu faz) atıldı. Üzerine soğuk PBS (fosfatlı tuz tamponu) eklenerek buzda bekletildi. Ardından beyaz kan hücre süspansiyonundan alikod ayrılarak 15-25^{0}C aralığında 3 dakika 600x*g'* de santrifüje edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı. Kalan pellete 200µl PBS eklenerek hücreler süspanse edildi. Süspansiyon tüpe aktarılarak -80^{0}C'de saklandı.

3.6.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu = PCR (DNA'nın PCR ile çoğaltılması)

A. Genel Reaksiyon Karışımı (50 µl reaksiyon hacmi)

Taq Polimeraz (5 ünite/ µl)	0,5 µl
10 X PCR Çözeltisi II (Mg2+)	5 µl
25 mM MgCl2 (son 2,5 mM)	5 µl
dNTP Karışımı (2,5 mM her biri)	8 µl
Kalıp DNA	<1 µg
Forward primer	0,2-1,0 µM (son con.)
Reverse primer	0,2-1,0 µM (son con.)
Steril distile su	50 µl'ye kadar

B. Kullanılan Primer Dizileri

Tablo 3.2: Primer Sıralamaları

1- SOD2 - 1
2- SOD2 - 2
3- UCP 1
4- UCP 2
5- UCP 3
6- SIRT1 - 1
7- SIRT1 - 2
8- SIRT1 - 3
9- SIRT3 - 1
10-SIRT3 -2
11-SIRT4

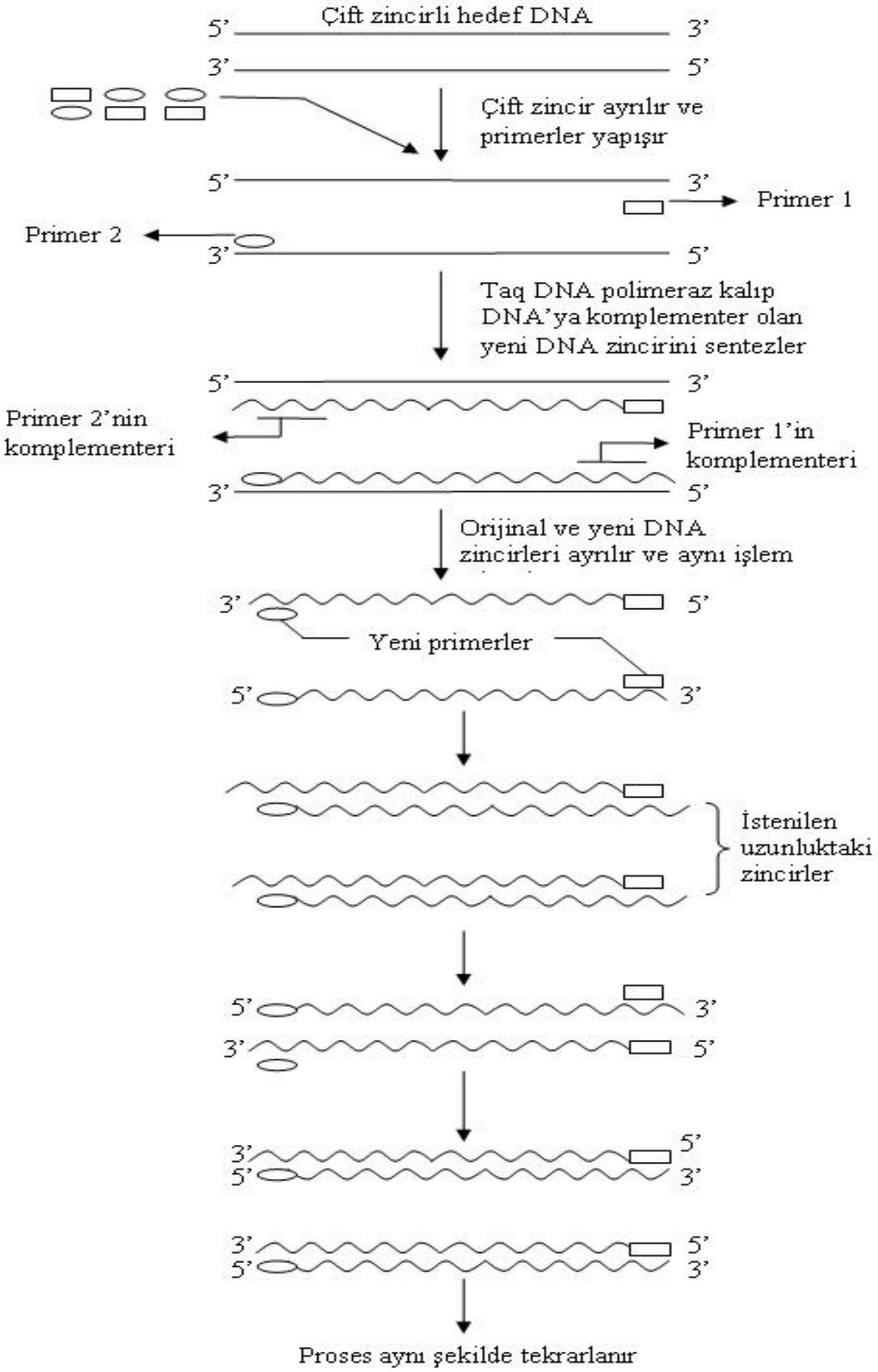
Tobla 3.3: Primer Dizileri

Primer Adı	Baz Dizisi 5'-3'	Amplikon Boyu
SOD2_F1	ACATTTACGCCTCATGCCCT	7012
SOD2_R1	TAGGTCCCAAGGTCGGCTTA	
SOD2_F2	GCTATGACTAGGGCAGGCAC	7209
SOD2_R2	GGAGGGCATGAGGCGTAAAT	
UCP1_F	TGCCATGCACAGGTGAGTAA	10443
UCP1_R	ACCGAGCGAGAATGGGAATG	
UCP2_F	AACTTTCCAAGGGACGGGAC	3843
UCP2_R	TGGAGTCTTGCTGAGGGACT	
UCP3_F	CTCCTGTGGCTTCACGTCAT	7715
UCP3_R	ACCAATCTCAGCTCCAGCAC	
SIRT1_F1	AATTTGGCTGCACTACACGC	9436
SIRT1_R1	TTAGGTTCATCGGCAGGGC	
SIRT1_F2	GACGGTGGAGTCTTGGTACTT	6020
SIRT1_R2	ACTGCTAAAGCCACGAGATATGG	
SIRT1_F3	AGGAGCAGAACTTGAGCGTT	6262
SIRT1_R3	ACTGGTCTGGTGAGACTAATGTA	
SIRT3_F1	ATTCGTATGGCACCCAGTTGT	8591
SIRT3_R1	CAGCCTTTGTGACCCGGAAT	
SIRT3_F2	CCAACATGCTAGAAGTGCGG	8420
SIRT3_R2	AGTGTTCGGTGTAGGCCAAAT	
SIRT4_F	TGACCAGAAAGAGCCGACAG	11000
SIRT4_R	TCCACACATTAAGATACCTAGAACC	

C) Prensip: PCR, ilk defa 1980'de Kary Mullis tarafından geliştirilmiştir. Bu reaksiyonda, dizi bilinen iki bölge arasında kalan bir DNA parçası enzimatik olarak çoğaltılır. Bunun için primer olarak bir çift oligonükleotid kullanılır. Bu oligonükleotid, çoğaltılacak olan DNA parçasının yanında bulunan dizilere eştir. Primerler, 18-20 nükleotid uzunluğunda sentetik olarak hazırlanan DNA yapısında dizilerdir. Kalıp DNA, önce 2 oligonükleotidin ve 4 deoksinükleotid trifosfat (dNTP) varlığında ısıyla denatüre edilir ve sonra kalıp dizilerine primerlerin yapışmasına olanak veren bir ısıya düşürülür. Yapışmış primerler uygun bir ısıya çıkarılarak Taq polimeraz (thermus aquaticus'tan elde edilen ısıya dayanıklı DNA polimeraz) ile uzatılır. Denatürasyon, primer bağlanması ve sentez basamaklarının sırayla tekrarlanması döngü şeklinde olur. DNA sentezi döngüsü yaklaşık 30 kez tekrarlanarak yeterli amplifikasyon ürünü (2 ürün) elde edilir.

PCR Mekanizması: 17,5 kb DNA fragmentinin amplifikasyonu

94 °C	1 dak.
98 °C	10 san. (30 Döngü)
68 °C	15 dak. (30 Döngü)
72 °C	10 dak.



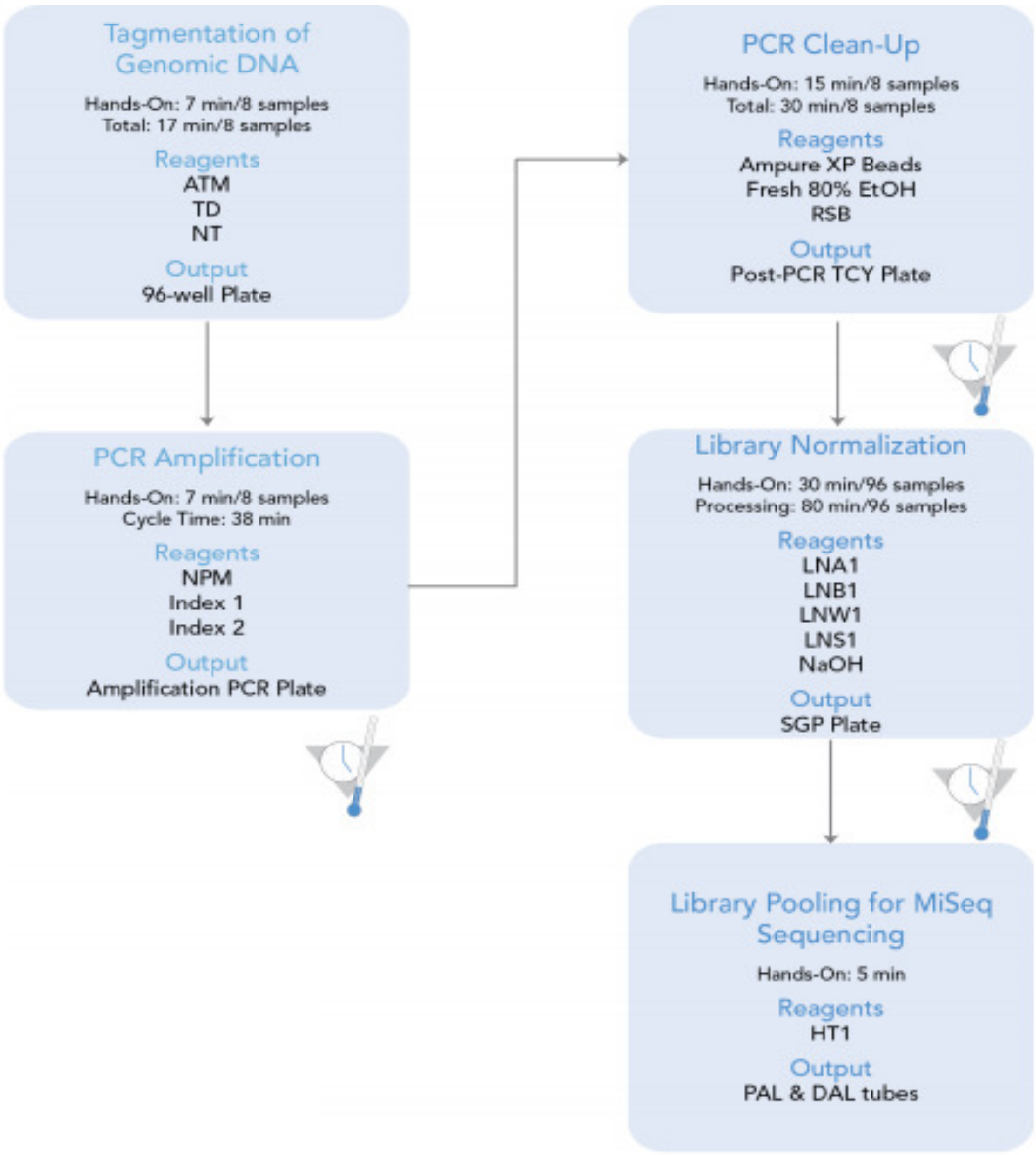
Şekil 3.1: Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Şematik Gösterimi

3.6.4. Jel Yürütmesi

PCR ile çoğaltılan ürünler % 3.5 'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek UV transilluminatörde polaroid kamera ile jelin fotağrafı çekilerek PCR ürünleri kontrol edildi. 3.5 g Agaroz tartılarak 100 mL 1x TBE tamponuna eklendi ve manyetik karıştırıcıda karıştırılarak homojenize edildi. Jel üzerine 2-3 µL Etidyum bromür eklenerek karıştırıldı. Haz1rlanan jel tank içine dökülerek 20 dakika kadar donmas1 beklendi. Donma işleminden sonra daha önce hazırlanan 5 µL PCR ürünü ve 1-2 µL Bromfenol mavisi karışımı jele tatbik edildi ve 90 Mv elektrik ak1m1nda 30 dakika yürütüldü. Bantlar UV ışık altında bağımsız iki kişi tarafaraf1ndan incelenerek PCR ürünlerinin oluşup oluşmadığı kontrol edildi.

3.6.5. Nextera XT Amplikon Dizileme

Dizileme Prensibi: Amplikon dizileme protokolü, 96 indekse kadar PCR ürünlerinin dizilmesinde kullanıldı Protokol dahilinde 'NexteraXT DNA Kütüphane Hazırlık Kiti' ve 'NexteraXT İndeks Kit' içeriklerinden yararlanıldı. Bu şekilde DNA fragmentasyonu ve adaptör dizi eklemeleri yapılarak kalıp DNA dizileme cihazına uygun hale getirildi. Uygulana protokol aşağıdadır.



Şekil 3.2: Dizileme Basamakları

Örneklerin fragmentasyon ve adaptör ekleme aşamaları 'Tagmentasyon' olarak bilinmektedir. Tagmentasyona başlamak için gerekli DNA miktarı örnek başına 1 ng'dır. Bu aşama Hard Shell Plate kuyularında çalışıldı. PCR ürünleri temizlendikten sonra Qubit cihazı solüsyonları ile önce 2 ng/µl konsantrasyona seyreltildi. Daha sonra 0,2 ng/µl'ye getirilen örnekler 5µl hacimde alınarak kuyulara yüklendi. Tagmentasyon, enzimatik fragmentasyon ve adaptör solüsyonları ile gerçekleştirildi.

Tagmente edilen DNA, indeks primerleri ve Nextera PCR Mastermix ile PCR reaksiyonuna tabi tutuldu. 12 döngülük PCR ile tagmente DNA'nın uçlarına indeks diziler eklenerek her örneğin ayrı indeks ile barkodlanması sağlandı. Böylece son aşama olan pooling ile örnekler karıştırıldığı zaman hangi örneğin hangi indekse ait olduğu anlaşılabildi. PCR aşamasından sonra manyetik beadler ve etanol yardımıyla clean-up yapıldı.

PCR ürünleri temizlendikten sonra tekrar normalize edilerek Qubit ile DNA ölçümleri yapıldı. Tüm örnekler 2 nmol'e eşitlenerek buffer solüsyon ile pooling yapıldı. Bu şekilde tüm dizileme örneklerinin tek bir tüpte toplanması sağlanır.

Örneklerin MiSeq cihazına yüklenmesi için pool DNA kütüphanesi önce denatürasyon ve dilüsyon aşamalarına tabi tutuldu. Son olarak 600 µl hacimde kartuşa yükleme yapılarak dizileme reaksiyonu başlatıldı.

4. BULGULAR

4.1.Biyokimyasal Bulgular

Hasta ve sağlıklı grup olgularına ait biyokimyasal veriler İstanbul Üniversitesi İç Hastalıklar ABD Metabolizma Hastalıkları ve Endokrinoloji BD Poliklinikleri arşivinde yapılan tarama sonucu ve/veya olguların rutin tahlilleri sonrası kan glukoz, HbA_1c, Kolesterol, Trigliserit, HDL-Kol ve LDL-Kol değerleri elde edildi.

Tablo 4.1: Hasta ve Sağlıklı olguların biyokimya değerleri

Parametreler [b]	Kontrol	DM	Diyabetik NP'li	Diyabetik NP'siz	P değeri[a]
Glukoz (mg/dl)	93±8	140±72	174±80	166±62	0,00
HbA_1c (%)	3,35±2,71	5,79±2,53***	5,49±2,66***	5,95±2,51***	
Kolesterol(mg/dl)	183±38	193±34	195±45	188±32	0,43
Trigliserit(mg/dl)	114±62	218±45	246±100	190±76	0,002*
HDL-kol(mg/dl)	56±19	52±21	55±35	49±13	0,33
LDL-kol(mg/dl)	123±22	124±31	119±32	127±43	0,82

***: P<0,001, Kontrol Grubu ile karşılaştırıldı

*: P<0,01

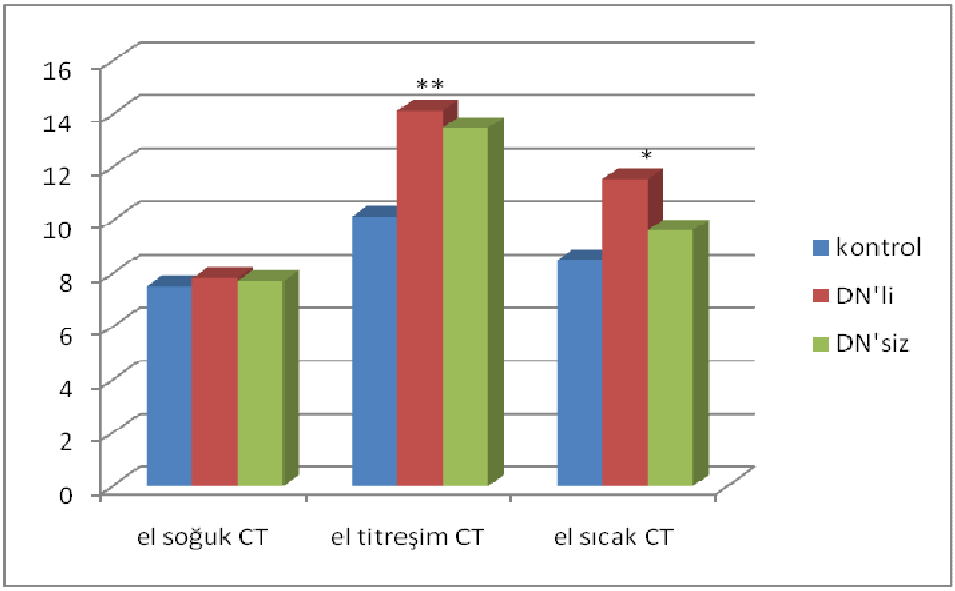
[a]: bütün gruplar arasında karşılaştırma yapıldı

[b]: ortalama±standart sapma

4.2.Isı-vibrasyon Bulguları

Çalışmamıza katılan 31 sağlıklı gönüllü ve 10 kişi diyabetik NP'li ve 18 kişi diyabetik NP'siz olmak üzere 28 diyabetik hastanın İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Sinirbilim AD'da bulunan *the CASE IV* Isı-Vibrasyon Cihazı (WR Medical Electronics.) kullanılarak Sayısallaştırılmış Duyu Testine dahil edildi. Test hasta ve sağlıklı olguların sol el ve sol ayaklarına uygulandı. Yapılan Isı-Vibrasyon testi (Sayısallaştırılmış Duyu Test, QST) sonucunda, hasta ve sağlıklı olguların soğuk, titreşim ve sıcaklık duyu testlerine ait hem el hem ayak sonuçları elde edildi.

Şekil 4.1: Soğuk-Titreşim-Sıcak duyu testi (Cooling-Vibration-Warming Computed Threshold) El: tüm gruplar

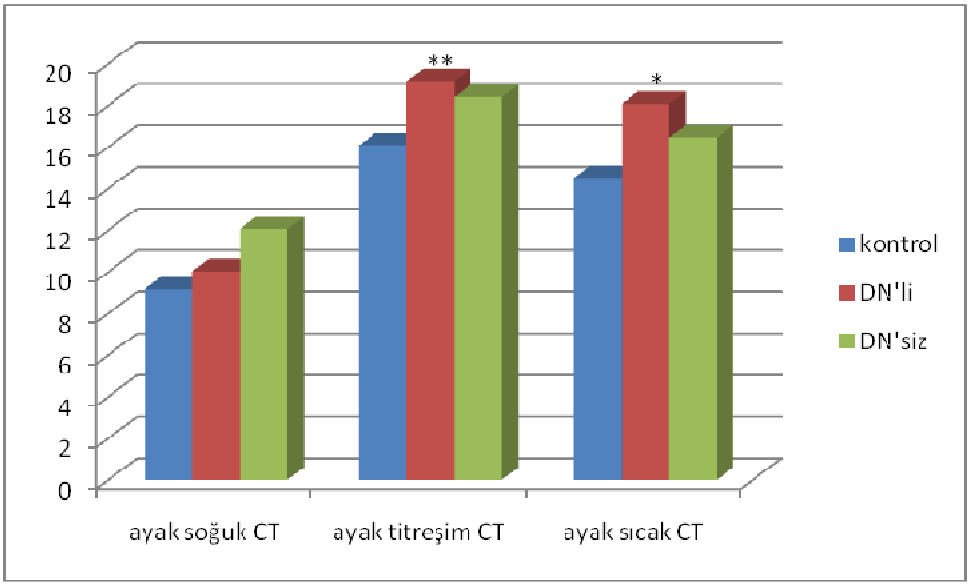


**: p<0,01 *: p<0,05

Sayısallaştırılmış duyu testi neticesince Şekli 4.1'de görüldüğü üzere elden soğuk testinde elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında her üç grupta da sonuçlar benzer bulunmuş ve bir anlamlılık ifade ermemiştir. Yine elden edilen sonuçlarda titreşim testi sonucunda diyabetik nöropatili hastalarda anlamlı bir şekilde daha yüksek sonuca ulaşılmıştır. Sıcak duyu testi neticesinde de diyabetik nöropatili hastarın sonuçları kontrol grubuna göre diyabetik nöropatisiz hastalardan daha yüksek elde edilmiştir (Şekil 4.1).

Şekil 4.2' de ise ayağa uygulanan soğuk, titreşim ve sıcak duyu testi sonuçları görülmekte ve titreşim ve sıcak testi sonuçlarında anlamlılık bulunmuştur.

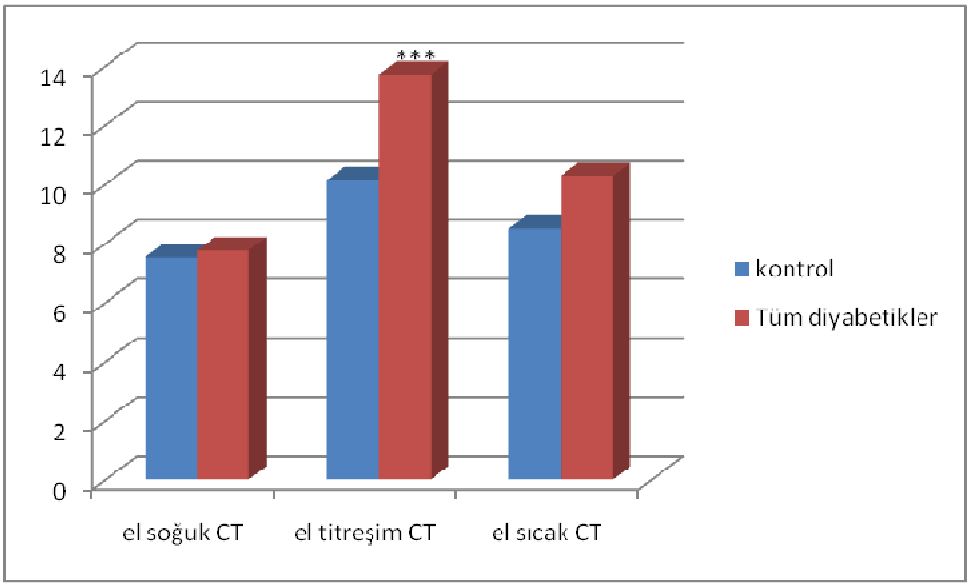
Şekil 4.2: Soğuk-Titreşim-Sıcak duyu testi (Cooling-Vibration-Warming Computed Threshold) Ayak: tüm gruplar



**:p<0,01 *: p<0,05

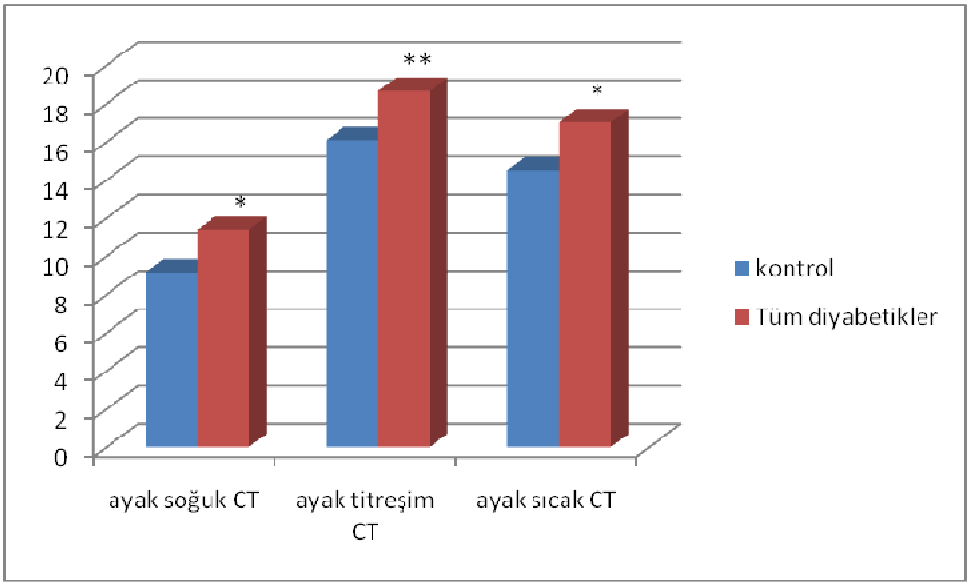
Tüm diyabetik hastalarla kontrol grubu karşılaştırıldığında elden elde edilen sonuçlara göre diyabetik hastalardan anlamlı bir şekilde daha yüksek sonuçlara ulaşılmıştır (p<0,05) (Şekil 4.3).

Şekil 4.3: Soğuk-Titreşim-Sıcak duyu testi (Cooling-Vibration-Warming Computed Threshold) El: control ve tüm diyabetik olgular



***p<0,001

Şekil 4.4: Soğuk-Titreşim-Sıcak duyu testi (Cooling-Vibration-Warming Computed Threshold) Ayak: control ve tüm diyabetik olgular



*: p<0,05

**: p<0,01

Şekil 4.4'te görüldüğü üzere kontrol grubuyla tüm diyabetli hastalardan elde edilen sonuçlara göre ayaktan ulaşılan sonuçlarda titreşim ve sıcaklaklık testlerinde ditabetik hastalar anlamlı bir şekilde yüksek değerler vermiştir.

4.3. Polimorfizm Sonuçları

Çalışmamızda 31 sağlıklı olgu ile 10 diyabetik nöropatili ve 18 diyabetik nöropatisiz hastanın gen dizilemesi metoduyla polimorfizm incelenmesi yapıldı. Bu incelemede MnSOD, UCP1, UCP2, UCP3, SİRT1, SİRT3 ve SİRT4 genlerine ait polimorfik bölgeler tarandı. Kontrol, diyabetik nöropati ve diyabetik nöropatisiz hastalara ait polimorfik bölge okumaları ve dizileme sonuçları elde edildi.

Tablo 4.2: Kontrol ve tüm diyabetli hasta SNP karşılaştırma

GEN	Diyabetik hasta N (%)	Kontrol N (%)	P değeri
UCP1			
delesyon	9(37,50)	4(14,81)	0,06
rs2270565(T/A)	9(37,50)	4 (14,81)	0,06
rs13128910(T/C)	5(20,83)	1 (3,70)	0,07
MnSOD			
delesyon (CCCG)	6(25,00)	2 (7,41)	0,09
rs73802622(C/T)	6(25,00)	2(7,41)	0,09
rs5746106(T/C)	6(25,00)	2 (7,41)	0,09
rs574104(G/C)	6(25,00)	2 (7,41)	0,09
SIRT1 delesyon (AAAG)	5(20,83)	1 (3,70)	0,07
UCP2			
rs760207(G/C)	7(29,17)	2 (7,41)	**0,05**
rs760206(C/T)	6(25,00)	2(7,41)	0,09
rs2632725(A/T)	7(29,17)	2 (7,41)	**0,05**
rs2735572(C/T)	7(29,17)	2 (7,41)	**0,05**

Kontrol ve tüm diyabetli hastalar karşılaştırıldığında diyabetili hastalarda control grubuna göre UCP2 geninin rs760207(G/C) numaralı kısmı %29,17 oranında, rs2632725(A/T) numaralı kısmı %29,17 oranında ve rs2735572(C/T) numaralı bölgesi %29,17 oranında fazlaca bulunduğuna ulaşıldı.

Tablo 4.3: Kontrol ve Diyabetik Nöropatisiz hasta SNP karşılaştırma

GEN	Diyabetik Nöropatisiz hasta N (%)	Kontrol N (%)	P değeri
MnSOD			
Delesyon (CCCG)	5(35,71)	2(7,41)	**0,04**
rs73802622(C/T)	5(35,71)	2(7,41)	**0,04**
rs5746106(T/C)	5(35,71)	2(7,41)	**0,04**
rs5746104(G/C)	5(35,71)	2(7,41)	**0,04**
UCP2			
rs760207(G/C)	4(28,57)	2(7,41)	0,09
rs2632725(A/T)	4(28,57)	2(7,41)	0,09
rs2735572(C/T)	4(28,57)	2(7,41)	0,09

Diyabetik nöropatisiz hastalar ile kontrol grubu karşılaştırıldığında hastaların %35,71 oranında MnSOD genine ait CCCG dizi bölgelerinde delesyon, yine aynı genin rs73802622(C/T), rs5746106(T/C) ve rs5746104(G/C) bölgeleri %35,71 oranında kontrollere göre istatistiki olarak anlamlılık bulundu ($p<0,05$).

Tablo 4.4: Kontrol ve Diyabetik Nöropatili hasta SNP karşılaştırma

GEN	Diyabetik Nöropatili hasta N (%)	Kontrol N (%)	P değeri
UCP1 rs13128910(T/C)	3(30)	1(3,70)	**0,05**

Diyabetik nöropatili hastaların UCP1 geninin rs13128910(T/C) bölgesi kontrol grubuna göre % 30 oranında anlamlı şekilde artmış bulundu ($p=0,05$).

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda diyabete bağlı olarak gelişen polinöropatide, sayısallaştırılmış duyu testiyle (QST) ince lif polinöropatisinin belirlenmesini, mitokondriyal Mangan Süperoksit Dismutaz (MnSOD), Eşleme Bozucu Proteinler (UCP-1, UCP-2, UCP-3) ve Sirtuinler (sirt-1, sirt-3, sirt-4) gibi antioksidanların genetik varyantlarının diyabetik polinöropati gelişimi üzerine etkilerini araştırmayı hedefledik.

Yine araştırmamızda diyabetik polinöropatinin duyular üzerine olan etkisine ilave olarak daha önce Türkiye toplumunda değerlendirilmemiş olan mitokondriyal gen polimorfizmlerinin diyabetik polinöropatiye olan etkisini araştırdık. Mitokondriyal bazı antioksidan genlerde bulunan farklı varyantların diyabet ve diyabetik polinöropatiye olan yatkınlık ve eğilimlerin derecelerine ulaşmaya çalıştık.

Diyabetli hastalarda polinöropatinin anlaşılabilmasi ve tanı ve tedavi şeklinin belirlenmesinde çeşitli elektrofizyolojik testler yapılır: klinik muayene, sayısallaştırılmış duyu testi QST), çeşitli anketler, farklı elektrodiyagnostik testler, lazerli çağrışım patansiyeli (LEP), fonksiyonel nörogörüntüleme (fMRI ve PET) ve deri biyopsisi (39). Bu testlerden her biri farklı yapı ve fonksiyon içirir ve genel olarak birbirini tamamlayan niteliğe sahiptir.

Çoğu nörolojik hastalıklarda olduğu gibi diyabetik nöropatide de duyu fonksiyon kaybı belirleyicidir. Sayısal olarak bu kaybın belirlenmesi diyabetik ve diyabetik olmayanlarda nöropatinin ve aşamalarının belirlenmesinde gereklidir. Ağrı ve duyu eşiklerinde azalma, duyu ve hissetme genliğindeki artmanın belirlenmesi QST'nin klinikçiler ve araştırmacılar için önemini ortaya koyar (41).

Çalışmamızın ilk kısmında diyabeti olan ve diyabetle birlikte diyabetin tetiklediği polinöropati teşhisi konulmuş hastalarla sağlıklı katımcıların el ve ayaklarına uygulanan sıcaklık, titreşim ve soğukluk duyularına verdikleri yanıtları QST ile elde ettik ve değerlendirdik.

QST, zaman içinde gelişmiş ve bilgisayara aktarılmıştır. En gelişmiş olan sayısallaştırılmış duyu testi (*the CASE IV*); titreşim, sıcakllık, soğukluk ve ağrı algı eşiklerini ölçmek üzere dizayn edildi. Bu sistem kalın lif duyu fonksiyonu (titreşim) ile ince lif duyu fonksiyonunu (sıcaklık, soğukluk ve ağrı) değerlendirmeyi sağlar (42).

Boulton ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, özellikle titreşim testi ayak ülser gelişim riski olan hastalarda diyabetik ülserin belirlenmesinde en yararlı test olduğu ortaya kondu (43). 951 diyabetli hastayla yapılan bir çalışmaya göre de diyabetli hastaların nöropatik bulgularını güçlendirecek şekilde, sağlıklı katılımcılara göre titreşim eşikleri kaydadeğer derecede yüksek bulundu (44). Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara göre diyabetli hastarın tümünde hem elden hemde ayaktan elde edilen QST sonuçlarında titreşim duyu eşik değerleri sağlıklılardan belirgin olarak daha yüksek çıkmıştır ($p<0,001$). Bu da diyabetin duyular üzerine olan olumsuz etkisini desteklamektedir. Sadece diyabetik hastaların sonuçları değerlendirildiğinde ise polinöropati teşhisi konmuş diyabetlilerin özellikle sıcaklık duyusunda polinöropati teşhisi konmamış olanlaradan daha yüksek eşik değere sahip olduklarına ulaşıldı.

Gürsoy ve arkedaşlarının yaptığı çalışmaya göre QST ölçümlerinde en az bir anormallik görülme oranı %80,7 ve nöropatik ağrısı olmayan diyabetlilerin %77,14'ünün sonuçlarında anormallik bulunmuş, nöropatik ağrılı hastaların ise tamamında anormallik saptanmıştır. Yine aynı çalışmaya göre soğuk duyu eşiği nöropatik ağrılı hastalarda olmayanlara göre oldukça düşük, sıcak duyu eşiği yine oldukça yüksek ve titreşim eşiği de oldukça yüksek bulunmuştur (36). Çalışmamızda adı geçen çılışmadaki sonuçlara eşlik eder şekilde görülmüştür, her iki ayağa uygulanarak elde edilmiş bu sonuçlara (36) benzer fakat farklı olarak çalışmamızda QST alt ekstremitelerden yalnız sol ayağa uygulanmıştır. Buna rağmen diyabetiklerin QST sonuçları sağlıklılara göre daha belirgin anormalliktedir ($p<0,005$).

Çalışmamızda sağlıklı ve diyabetikler olmak üzere katılımcıların tümüne QST sol el ve sol ayağa uygulanmıştır. Duyu algı eşikleri el ve ayaklarda değerlendirilirken farklılıklar görülmüştür. Sağlıklı ve diyabetli gruptan elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında el duyu algı eşikleri ayağa göre daha düşüktür yani elin duysal olarak daha hassas olduğu sonucu da çalışmamızca desteklenmiştir.

Sayısallaştırılmış duyu testi sonuçları değerlendirildiğinde diyabetli hastaların sağlıklı gruba göre vibrasyon duyu eşik değerleri oldukça anlamlı bir şekilde fazla bulundu ($p<0,001$). Çalışmamızdan elde edilen QST sonuçlarına göre diyabetik hastaların

sağlıklı gruba göre eşik değeri daha belirgin duyu hissine sahip olduğu ön plandadır. Aynı zamanda çalışmamız dahihinde tek başına olmasa da QST'nin nöropati bulgularını desteklediğini ve bu testin klinikçiler için sadece diyabetin tetiklediği değil diğer etkenler sonucu oluşabilecek polinöropati teşhis ve tanı koymayı kolaylaştıcı olduğu netleşmiştir. Aynı zamanda EMG ile tanımlanabilen kalın lif polinöropatine ilave olarak EMG ile tanımlanamayabilen ince lif polinöropatisinin teşhisi için aydınlatıcı ve fikir verici olarak da yine QST yardımcı bir testtir.

Çalışmamızın diğer bir kısmında ise mitokondriyal MnSOD, UCP1, UCP2, UCP3, SIRT1, SIRT3 ve SIRT4 antioksidan genlerin diyabetik polinöropati gelişimine etkisini araştırdık. Bu antioksidan genlerin diyabet ve diyabetin tetiklediği polinöropati gelişimine olan etkisini gözlemledik.

Diyabetik nöropati patogenezi tam olarak anlaşılamamasına rağmen, artmış aldoz redüktaz aktivitesi, azalmış nörotrofik destek, artmış reaktif oksijen türleri (ROS) ve proteinlerin enzimatik olmayan glikozilasyonu gibi faktörlerin diabetin patogenezinde rol oynadığı öne sürülmektedir (40). Hücre içinde artan ROS'nin etkisini azaltan ve ROS'ni ortadan kaldıran antioksidan mekanizmalar; diyabetik nöropatili hastalarda azalmış, değişikliğe uğramış veya fonksiyon kaybetmiştir. Bu antioksidan mekanizmalarla ilişkili olan MnSOD, UCP1, UCP2, UCP3, SIRT1, SIRT3 ve SIRT4 enzim ve proteinlerinin aktivitelerinin diyabetik hastalarda değişiklik gösterdiği bulunmuştur (26, 34).

Literatürde, UCP2 Ala55Val, UCP3 -55C/T ve UCP1 -3826 A/G polimorfik bölgelerinin Tip1 ve Tip2 diyabet riskiyle ilişkili bulunmuştur (47-48). Mitokondriyal süperoksit radikallerinin temizlenmesinde görevli olan MnSOD da bizim de çalıştığımız 4880 Val16Ala ilgili çalışmalarda, Alanin taşınmasının diyabet açısından koruyucu olduğu gösterilmiştir (49).

Hücre içinde NAD^+ bağımlı deasetilasyonda görevli olan Sirtuin ailesinden SIRT1 rs12778366 noktasının daha eksprese olduğu yönünde çalışma bulunmaktadır (50). Yapılan diğer bir çalışmada rs10509291 ve rs 7896005 bölgelerinin Tip 2 diyabetle

ilişkili olduğu saptanmıştır (51). Japon toplumunda diyabetik nefropati ile SIRT1 rs3740051, rs2236319 ve rs2273773 bölgelerinin ilişkili olduğu bildirilmiştir (52).

Çalışmamızın genetik sonuçlarına göre kontrol ve tüm diyabetli hastalar karşılaştırıldığında diyabetili hastalarda control grubuna göre UCP2 geninin rs760207(G/C) numaralı kısmı %29,17 oranında, rs2632725(A/T) numaralı kısmı %29,17 oranında ve rs2735572(C/T) numaralı bölgesi %29,17 oranında fazlaca bulunduğuna ulaşıldı. Bu da gösteriyor ki UCP2 geninin ilgili kısımları diyabet için bir risk oluşturmakta, bu bölgeleri fazlaca taşıyan insanlar için uyarıcı bir risk faktörü olarak görülmektedir. Yine nöropatisi olmayan diyabetli hastalar ile kontrol grubu karşılaştırıldığında hastaların %35,71 oranında MnSOD genine ait CCCG dizi bölgelerinde delesyon, aynı genin rs73802622(C/T), rs5746106(T/C) ve rs5746104(G/C) bölgeleri %35,71 oranında kontrollere göre anlamlıca daha fazla bulundu. Denilebilir ki, MnSOD genine ait bu bölgeler diyabete yatkınlık açısından bir risk oluşturmaktadır. Diyabetik nöropatili hastaların UCP1 geninin rs13128910(T/C) bölgesi kontrol grubuna göre % 30 oranında anlamlı bir şekilde fazla görüldü.

Çalışmamızın sonuçlarına göre UCP1, UCP2 ve MnSOD genlerinin bazı bölgeleri diyabetli hastalada anlamlı bir şekilde ($p<0,005$) fazlaca bulunmuştur. Bu genlere ait ilgili gen bölgeleri diyabete yatkınlık açısından bir risk oluşturabilir denilebilir.

Çalışmamız Türkiye toplumunda diyabetli ve diyabetik nöropatili hastalarda hem QST ile duyuların yanıtlarının derecelerinin hem de mitokondriyal bazı antioksidan gen varyantlarının diyabet ve diyabetik polinöropatiye etkilerinin araştırılması bakımından özgündür. Elbette bu çalışmada elde edilen bulguların daha da belirginleşmesi ve genellenmesi adına özellikle hasta ve kontrol olgu sayılarının arttırılması QST sonuçlarının ve genetik varyant sonuçlarının daha anlamlı bir sonuç vermesi için önemlidir. Çalışmamıza katılan hasta ve kontrol olgu sayısının azlığı sonuçların anlamlılığı güçleştirdi.

KAYNAKLAR

1. F Arnold Gries, Norman E Cameron, Phillip A Low. Diabetes Mellitus, Textbook of Diabetic Neuropathy, 2003:1-16
2. Barry J Goldstein, Dirk Müler-Wieland. Tip II Diyabetin Epidemiyolojisi ve Tanısı Diyabetik Nöropati ve Cinsel Fonksiyon, Tip II Diyabet, 2003:1-223
3. Gareth Williams, John C Pickup. Classsification of Diabetes, Handbook of Diabetes 2000:20
4. Cumhur Ertekin. Diyabetik Nöropatiler, Santral ve Periferik EMG Anatomi-Fizyoloji-Klinik, Türkiye 2006:211-228
5. Neşe Özbey, Yusuf Orhan. Diabetes Mellitus, Türkiye 2003:2
6. A.Emre Öge, Sara Zarko Bahar. Nöroloji, Türkiye, Nobel Tıp Kitap Evleri 2004:617
7. Conbarth DR, Chaudhry V, Carter Ketal. Total Neuropathy Score validation and reliability study. Neurology 1999;53:1660
8. Ivan T, Vera B. Glycemic control is related to the electrophysiologic severity of diabetic peripheral sensorimotor polyneuropathy. Diabetes care 1998;21:1749-1752
9. Kikkawa Y, Kuwabara S, Misawa S, Tamura N, Kitano Y. The acute effects of glycemic control on nevre conduction in human diabetics. Clinical Neurophysiology 2005;116(2):270-274 31
10. Ohgaki K, Nakano K, Shigeta H, Kitagawa Y, Nakamura N. Ratio of motor nevre conduction Velocity to F-Wave conduction Velocity in Diabetic Neuropathy. Diabetes care 1998; l21(4):615-618
11. Shin JB, Seong JY, Lee HJ, Kim SH, suk Huen., Lee YJ. The Usefulness of Minimal F-wave Latency and Sural/Radial Amplutude Ratio in Diabetic Polyneuropathy. Yonsei Medical Journal 2000;41(3):393-397
12. Satılmış Z.I., Nöroloji Uzmanlık Tezi, Diyabetes Mellitusda İnsülin Tedavisinin Periferik Sinir Sistemine Etkileri: Klinik ve Elektofizyolojik Değerlendirilmesi, İstanbul 2007

13. Öge A.E., Gülşen Parman Y., İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi Nöroloji, Periferik Sinirlerin Yaygın Ve Çok Odaklı Hastalıkları, İstanbul 2009
14. Apfel S.C.: Nerve regeneration in diabetic neuropathy. Diabetes, Obesity and Metabolism. 1999; 1: 3-11.
15. Bradley J.L., King R.H.M., Muddle J.R., Thomas P.K.: The extracellular matrix of peripheral nerve in diabetic polyneuropathy. Acta Neuropathol. 2000; 99: 539-546.
16. Daiber A., Oelze M., Wenzel P., Wickramanayake J.M., Schuhmacher S., Jansen T., Lackner K.J., Torzewski M., Münzel T.: Nitrate tolerance as a model of vascular dysfunction: roles for mitochondrial aldehyde dehydrogenase and mitochondrial oxidative stress. Pharmacol Rep. 2009 Jan-Feb;61(1):33-48.
17. Gérard Said.: Diabetic Neuropathy-A Review. Nat Clin Pract Neurol. 2007;3(6):331-340.
18. Hill R.E., Williams P.E.: Perineurial cell basement membrane thickening and myelinated nerve fibre loss in diabetic and nondiabetic peripheral nerve. Journal of the Neurological Sciences. 2004; 217: 157-163.
19. Inoue T, Hiratsuka M., Osaki M., Oshimura M.: The molecular biology of mammalian SIRT proteins: SIRT2 in cell cycle regulation. Cell Cycle. 2007 May 2;6(9):1011-8.
20. Kelly G.: A review of the sirtuin system, its clinical implications, and the potential role of dietary activators like resveratrol: part 1. Altern Med Rev. 2010 Sep;15(3):245-63.
21. King R.H.M.: The role of glycation in the pathogenesis of diabetic polyneuropathy. J Clin Pathol:Mol Pathol. 2001; 54: 400-408.
22. Nègre-Salvayre A., Hirtz C., Carrera G., Cazenave R., Troly M., Salvayre R., Pénicaud L., Casteilla L.: A role for uncoupling protein-2 as a regulator of mitochondrial hydrogen peroxide generation. FASEB J. 1997 Aug;11(10):809-15.
23. Scandalios J.G.: Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. Braz J Med Biol Res. 2005 Jul;38(7):995-1014.
24. Sheetz M.J., King G.L.: Molecular understanding of hyperglicemia's adverse effects for diabetic complications. JAMA 2002; 288: 2579-2588.
25. Simmons Z., Feldman E.L.: Update on diabetic neuropathy. Current Opinion in Neurology. 2002; 15: 595-603.

26. Sluse F.E., Jarmuszkiewicz W., Navet R., Douette P., Mathy G., Sluse-Goffart C.M.: Mitochondrial UCPs: new insights into regulation and impact. Biochim Biophys Acta. 2006 May-Jun;1757(5-6):480-5.
27. Sugimoto K., Murakawa Y., Sima A.A.F.: Diabetic neuropathy-a continuing enigma. Diabetes Metab Res Rev. 2000; 16: 408-433.
28. Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T., Mazur M., Telser J.: Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol. 2007;39(1):44-84.
29. Van Dam P.S.: Oxidative stress and diabetic neuropathy: pathophysiological mechanisms and treatment perspectives. Diabetes Metab Res Rev. 2002; 18: 176-184,
30. Verdin E., Hirschey M.D., Finley L.W., Haigis M.C.: Sirtuin regulation of mitochondria: energy production, apoptosis, and signaling. Trends Biochem Sci. 2010 Dec; 35(12): 669-75.
31. Williams P.E., Lowry A., Hill R., Masson E.: Relationship between fascicle size and perineural collagen IV content in diabetic and control human peripheral nerve. Histopathology. 2000; 36: 551-555.
32. Wolkow C.A., Iser W.B.: Uncoupling protein homologs may provide a link between mitochondria, metabolism and lifespan. Ageing Res Rev. 2006 May;5(2):196-208.
33. Yasuda H., Terada M., Maeda K., Kogawa S., Sanada M., Haneda M., Kashiwagi A., Kikkawa R.: Diabetic neuropathy and nerve regeneration. Progress in Neurobiology. 2003; 69: 229-285.
34. Zelko I.N., Mariani T.J., Folz R.J.: Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. Free Radic Biol Med. 2002 Aug 1;33(3):337-49.
35. Gürsoy A.E., Kocasoy-Orhan E., Dinççağ N., Yücel A., Ertaş M., Painful Diabetic Neuropathy in Type II diabetic patients: Evaluation with different diagnostic modalities, General Endocrinology, 2013; IX/2; 189-200, doi: 10.4183/aeb.2013.189
36. Çapoğlu İ, Ünüvar N. Diabetes mellitusun yeni tanı kriterleri ve sınıflandırılması. Türkiye Tıp Dergisi 2001; 8(1):3-8

37. Satılmış Z.I., Nöroloji Uzmanlık Tezi, Diyabetes Mellitusda İnsülin Tedavisinin Periferik Sinir Sistemine Etkileri: Klinik ve Elektofizyolojik Değerlendirilmesi, İstanbul 2007
38. F Arnold Gries, Norman E Cameron, Phillip A Low. Diabetes Mellitus, Textbook of Diabetic Neuropathy, 2003:1-16
39. Cruccu G, Anand P, Attal N, Garcia-Larrea L, Haanpa¨a¨ M, Jorum E, et al. EFNS guidelines on neuropathic pain assessment. Eur J Neurol 2004;11:153–62.
40. Apfel S.C.: Nerve regeneration in diabetic neuropathy. Diabetes, Obesity and Metabolism. 1999; 1: 3-11.
41. Yarnitsky D., Pud D. Quntitative Sensory Testing, Clinical Neurophysiology, Volume I, 2004 Elsevier
42. Gruener G., Dyck P.J., Quantitative Sensory Testing: Methodology, Applications, and Future Directions, Journal of Clinical Neurophysiology, 1994. 11(6):568-583
43. Boulton, A. J. M., Hardisty, C. A., Betts, R. P., Franks, C. I., Worth, R. C., Ward, J. D. and Duckworth, T. (1983) Dynamic foot pressure and other studies as diagnostic and management aids in diabetic neuropathy. Diabetes Care, 6, 26–33.
44. Le Quesne, P. M. and Fowler, C. J. (1987) Quantitative evaluation of toxic neuropathies in man. In The London Symposia, EEG Journal Supplement (eds. R.J. Ellingson, N.M.F. Murray and A.M. Halliday), Elsevier, Amsterdam, pp. 347–354.
45. International Diabetes Federation, IDF Diabetes Atlas Sixth Edition Update, International Diabetes Federation 2014
46. Diabetes Control and Complications Trial Research Group: Neuropathy Among the Diabetes Control and Complications Trial Cohort 8 Years After Trial Completion, Diabetes Care, 29(2):340-344, 2006
47. B. M. de Souza, L. A. Brondani, A. P. Boucas et al., "Associations between UCP1 -3826A/G, UCP2 -866G/A, Ala55Val and Ins/Del, and UCP3 -55C/T polymorphisms and susceptibility to type 2 diabetes mellitus: case-control study and meta-analysis," PLoS One, vol. 8, no. 1, article e54259, 2013.

48. K. Xu, M. Zhang, D. Cui et al., "UCP2 -866G/A and Ala55Val, and UCP3 -55C/T polymorphisms in association with type 2 diabetes susceptibility: a meta-analysis study," Diabetologia, vol. 54, no. 9, pp. 2315–2324, 2011

49. Vats P(1), Sagar N, Singh TP, Banerjee M. Association of Superoxide dismutases (SOD1 and SOD2) and Glutathione peroxidase 1 (GPx1) gene polymorphisms with type 2 diabetes mellitus. Free Radic Res. 2015 Jan;49(1):17-24. doi: 10.3109/10715762.2014.971782. Epub 2014 Oct 31.

50. Rai E(1), Sharma S, Kaul S, Jain K, Matharoo K, Bhanwer AS, Bamezai RN. The interactive effect of SIRT1 promoter region polymorphism on type 2 diabetes susceptibility in the North Indian population. PLoS One. 2012;7(11):e48621. doi: 10.1371/journal.pone.0048621. Epub 2012 Nov 1.

51. Dong Y(1), Guo T, Traurig M, Mason CC, Kobes S, Perez J, Knowler WC, Bogardus C, Hanson RL, Baier LJ. SIRT1 is associated with a decrease in acute insulin secretion and a sex specific increase in risk for type 2 diabetes in Pima Indians. Mol Genet Metab. 2011 Dec;104(4):661-5. doi: 10.1016/j.ymgme.2011.08.001. Epub 2011 Aug 7.

52. Maeda S(1), Koya D, Araki S, Babazono T, Umezono T, Toyoda M, Kawai K, Imanishi M, Uzu T, Suzuki D, Maegawa H, Kashiwagi A, Iwamoto Y, Nakamura Y. Association between single nucleotide polymorphisms within genes encoding sirtuin families and diabetic nephropathy in Japanese subjects with type 2 diabetes. Clin Exp Nephrol. 2011 Jun;15(3):381-90. doi: 10.1007/s10157-011-0418-0.

53. Bouhassira D, Letanoux M, Hartemann A (2013) Chronic Pain with Neuropathic Characteristics in Diabetic Patients: A French Cross-Sectional Study. PLoS ONE 8(9): e74195. doi:10.1371/journal.pone.0074195

54. Bouhassira D, Attal N, Alchaar H, Boureau F, Brochet B, Bruxelle J, Cunin G, Fermanian J, Ginies P, Grun-Overdyking A, Jafari-Schluep H, Lantéri-Minet M,Laurent B, Mick G, Serrie A, Valade D, Vicaut E. Comparison Of Pain Syndromes Associated With Nervous Or Somatic Lesions And Development Of A New Neuropathic Pain Diagnostic Questionnaire (Dn4). 2005 Mar;114(1-2):29-36.

FORMLAR

TİP2 DİABETES MELLİTUS (DM)' DA MİTOKONDRİAL GEN POLİMORFİZMLERİNİN SUBKLİNİK POLİNÖROPATİ GELİŞİMİNE ETKİSİ

OLGU RAPOR FORMU (ORF)

Adı ve Soyadı:

Doğum Yeri:

Doğum Tarihi (GG/AA/YYYY): ☐☐/☐☐/☐☐☐☐

Cinsiyet: ☐Kadın ☐Erkek

El Dominansı: ☐Sağ ☐Sol ☐Her İki El

Eğitim Düzeyi: ☐☐Yıl

Medeni Durum: ☐Evli ☐Bekar ☐Dul

Meslek: ☐Halen Çalışıyor (.....)

☐Halen Çalışmıyor (.....)

☐Hiç Çalışmamış (.....)

☐Diğer (Emekli, Öğrenci) (.....)

Akraba Evliliği: ☐Yok ☐Var

Var ise: ☐1. Derece ☐2. Derece ☐3. Derece

Hastanın Dahili ve Cerrahi Özgeçmişi:

Soygeçmişinde Psikiyatrik Hastalıklar:

Soygeçmişinde Hastalık (Ailede Ölüm Nedenleri, Organik Beyin Sendromu):

Boy: ☐.☐☐ m

Kilosu: ☐☐☐.☐ kg

Beden Kütle İndeksi (BKİ): ☐☐.☐☐ kg/m^2

Kan Basıncı: ☐☐☐/☐☐☐ mmHg

Sigara Kullanımı: ☐Hayır ☐Bırakmış ☐Evet

Evet ise, Kaç Yıldır? ve Ne Kadar? ☐Paket/Gün/☐☐Yıl

Bırakmış ise Kaç Yıldır Bırakmış ve Daha Önce Kaç Yıl Ne Kadar Sigara İçmiş?

☐☐Yıldır Bırakmış. Daha önce ☐Paket/Gün/☐☐Yıl İçmiş.

Alkol Kullanımı: ☐Hayır ☐Bırakmış ☐Evet

Evet ise, Kaç Yıldır? ve Ne Kadar? ☐Birim/Gün/☐☐Yıl

Bırakmış ise Ne Kadar Süredir İçmiyor? €€ Yıldır Bırakmış

Diyabet Başlangıç Yaşı: €€Yaş Hastalığın Süresi: €€Yıl

Kaç Yıldır Tedavi Görüyor? €€Yıl

Uygulanan Tedavi, Dozu ve Süresi

€Diyabet için Tedavi Almıyor

€OAD (.....)

€İnsülin (.....)

€OAD + İnsülin (.....)

€Diğer (.....)

DİYABETİN AKUT KOMPLİKASYONLARI

€DKA €HHD €Hipoglisemik Koma€Laktik Asidoz

DİYABETİN KRONİK KOMPLİKASYONLARI

Mikrovasküler Komplikasyonlar

Diyabetik Retinopati:

€Nonproliferatif €Proliferatif

Diyabetik Nefropati:

€Hiperfiltrasyon €Mikroalbüminüri

€Klinik Nefropati €Son Dönem Böbrek Yetersizliği

Diyabetik Nöropati:

€Simetrik Distal Polinöropati (Duyusal ve Sensorimotor DPN)

€Otonom Nöropati

€Asimetrik Mmononöropati (Monoropati Mültipleks)

€Kraniyal Sinirleri Tutan Nöropati

€Periferik Sinirleri Tutan Nöropati

Makrovasküler Komplikasyonlar

€Koroner Arter Hastalığı €Serebrovasküler Hastalık

€Periferik Arter Hastalığı €Diyabetik Ayak

ELEKTROFİZYOLOJİK TESTLER

EMG:

CASE IV QST (Isı ve Vibrasyon Testi):

BİYOKİMYA TESTLERİ

Mikroalbuminüri: €€€€.€€ (€ mg/L, € mg/gün, € µg/dk, € mg/g Kreatinin)

HbA_{1c} (A1C): €€.€€ %

Açlık Kan Glukoz: €€€.€ mg/dL

Üre: €€€.€€ mg/dL

Kreatinin: €€.€€ mg/dL

Ürik Asit: €€.€€ mg/dL

AST: €€€€.€€ U

ALT: €€€€.€€ U

GGT: €€€.€€ U

Total Kolesterol: €€€€.€€ mg/dL

HDL-Kolesterol: €€€.€€ mg/dL

LDL-Kolesterol: €€€€.€€ mg/dL

Trigliserid: €€€€.€€ mg/dL

Sedimantasyon: €€€/€€ mm/st

CRP-hs: €€€.€€ mg/L (CRP: €€€.€€ mg/dL)

B12 Vitamin: €€€€.€€ pg/mL

Folat: €€.€€ ng/mL

HEMOGRAM

WBC: €€.€€€ /mm^3

RBC: €.€€€.€€€ /mm^3

PLT: €€€.€€€ /mm^3

Hgb: €€.€€ g/dL

Htc: €€.€€ %

MCV: €€€.€€ μ^3

MCH: €€.€€ g/dL

MCHC: €€.€€ %

OTOANTİKORLAR

Anti-GAD: € Negatif Pozitif €€.€€ U/mL

ICA: € Negatif Pozitif €€€.€ JDF U

TİP2 DİABETES MELLİTUS (DM)' DA MİTOKONDRİAL GEN POLİMORFİZMLERİNİN SUBKLİNİK POLİNÖROPATİ GELİŞİMİNE ETKİSİ
BİLGİLENDİRİLMİŞ OLUR FORMU

Bu katıldığınız çalışmada, İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Diyabet Polikliniğine başvuran hastalar arasından Diyabetik Polinöropati ve Diyabet tanısı konmuş hastalar ve sağlıklı gönüllüler seçilip, hiperperglisemi sonucu oluşan oksidatif stresin sebep olabileceği diyabetik nöropatide (DN), mitokondrinin başlıca antioksidantı olan MnSOD (Ala9Val) ve antioksidan etkileri olabileceği iddia edilen mitokondrial uncouple (UCP-1 (+816G/A), UCP-2 (-1890A/G), UCP3 (-2078C/T)) ve sirtuilerin (sirt-1, sirt-3, sirt-4) polimorfik variantların etkileri ile ince lif polinöropatisi arasındaki ilişkiyi incelemeyi amaçlamaktayız.

Çalışma kapsamında sizin sağ ya da sol ön kolunuzdan 10 (on) mililitre kadar venöz kan alınacaktır. Bu kan alma işlemi muhtemelen birincide, az bir ihtimalde olsa ikincide olabilir. Kan alımı sırasında azda olsa bir ağrı duyabilirsiniz. Enjektörün damardan çıkmasını takiben çıkan yer üzerine pamukla 1-2 dakika kompres yapmalısınız, bu yapılmazsa kan alınan yerde damar dışına sızan kan nedeniyle sonraki günlerde ekimoz (morarma) ve ağrı olabilir. Bu kan alma işlemi sadece bir kez yapılacaktır. İkinci aşama olarak, sayısallaştırılmış sıcak- soğuk duyusu ayırt etme ile titreşim testine tabi tutulacaksınız. Bu test sırasında sizlere oldukça küçük miktarlarda sıcak-soğuk uygulamalar ve titreşim uygulamaları verilecek, sizlerin vereceğiniz yanıtlar kaydedilecektir. Bu test Isı-Titreşim düzeneği, QST, olarak adlandırılmaktadır ve sizlerde herhangi bir olumsuz yanıt oluşturmayacaktır.

Bu çalışma sonuçlarıyla klinik ilişkiler kurulabilmesi amaçlanmaktadır. Ülkemiz insanlarının adı geçen hastalık grubu ile ilgili genetik yatkınlıkları belirlenerek, hastalık belirtileri ortaya çıkmadan önce potansiyel hastalığı belirleme imkanı bulunacağı inancındayız.

Bu çalışmanın sonuçları bir yılda elde edilecek, sizlere sonuçlar hakkında açık ve net bilgiler verilecektir. Bu araştırmada yer alacak gönüllülerin sayısı 100'dir.

Araştırma hakkında ek bilgiler almak için ya da çalışma ile ilgili herhangi bir sorun, istenmeyen etki ya da diğer rahatsızlıklarınız için 0212 4142000/33321 no.lu telefondan Biyolog Ali IŞIKLI' ya başvurabilirsiniz. Bu araştırmada yer almanız

nedeniyle size hiçbir ödeme yapılmayacaktır; ayrıca, bu araştırma kapsamındaki bütün muayene, tetkik, testler ve tıbbi bakım hizmetleri için sizden veya bağlı bulunduğunuz sosyal güvenlik kuruluşundan hiçbir ücret istenmeyecektir. Bu araştırmada yer almak tamamen sizin isteğinize bağlıdır. Araştırmada yer almayı reddedebilirsiniz ya da herhangi bir aşamada araştırmadan ayrılabilirsiniz; bu durum herhangi bir cezaya ya da sizin yararlarınıza engel duruma yol açmayacaktır. Araştırıcı bilginiz dahilinde veya isteğiniz dışında, çalışma programını aksatmanız nedeniyle sizi araştırmadan çıkarabilir. Araştırmanın sonuçları bilimsel amaçla kullanılacaktır; çalışmadan çekilmeniz ya da araştırıcı tarafından çıkarılmanız durumunda, sizle ilgili tıbbi veriler de gerekirse bilimsel amaçla kullanılabilecektir. Sizden alınan tıbbi numuneler sadece bu araştırmada kullanılacak, size ait tüm tıbbi ve kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır ve araştırma yayınlansa bile kimlik bilgileriniz verilmeyecektir, ancak araştırmanın izleyicileri, yoklama yapanlar, etik kurullar ve resmi makamlar gerektiğinde tıbbi bilgilerinize ulaşabilir.

Çalışmaya Katılma Onayı

Sayın Biyolog Ali IŞIKLI tarafından Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Sinirbilim AD'ında tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek yukarıda yer alan ve araştırmaya başlanmadan önce gönüllüye verilmesi gereken bilgileri okudum ve sözlü olarak dinledim. Aklıma gelen tüm soruları araştırıcıya sordum, yazılı ve sözlü olarak bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Çalışmaya katılmayı isteyip istemediğime karar vermem için bana yeterli zaman tanındı. Bu koşullar altında, bana ait tıbbi bilgilerin gözden geçirilmesi, transfer edilmesi, işlenmesi ve kan örneğimden elde edilecek materyalimin bu araştırmanın parçası olan daha sonraki yapılacak çalışmalarda kullanılması konusunda araştırma yürütücüsüne yetki veriyor ve söz konusu araştırmaya ilişkin bana yapılan katılım davetini hiçbir zorlama ve baskı olmaksızın büyük bir gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

Bu formun imzalı bir kopyası bana verilecektir.

Gönüllünün,

Adı-Soyadı:

Adresi:

Tel.-Faks:

Tarih ve İmza:

Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasinin,

Adı-Soyadı:

Adresi:

Tel.-Faks:

Tarih ve İmza:

Açıklamaları yapan araştırmacının,

Adı-Soyadı:

Görevi:

Adresi:

Tel.-Faks:

Tarih ve İmza:

Olur alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin/görüşme tanığının,

Adı-Soyadı:

Görevi:

Adresi:

Tel.-Faks:

Tarih ve İmza:

ETİK KURUL KARARI

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Sayı : 1167 **Tarih : 04.08.2014**

Konu : Doç.Dr. Elif ÖZKÖK

Sayın Doç.Dr. Elif ÖZKÖK
DETAE Sinirbilim Anabilim Dalı

İlgi :DETAE Sinirbilim Anabilim Dalının 11/06/2014 gün ve 111 sayılı yazısı

Sorumlu araştırıcılığını üstlendiğiniz ve Ali IŞIKLI'nın yürüteceği 2014/800 dosya numaralı "Tip2 Diabetes Mellitus (DM)'da Mitokondrial Gen Polimorfizmlerinin Subklinik Polinöropati Gelişimine Etkisi" başlıklı çalışma kurulumuzun 20/06/2014 tarih ve 12 sayılı sayılı sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof.Dr. A. Yağız ÜRESİN
İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar
Etik Kurul Başkanı

Eki: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Ali	**Soyadı**	IŞIKLI
Doğ.Yeri	Üsküdar	**Doğ.Tar.**	24.12.1978
Uyruğu	TC.	**TC Kim No**	48733800747
Email	a.isikli@yahoo.com	**Tel**	05305401463

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	**Mez. Yılı**
Doktora		
Yük.Lis.	Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü	2015
Lisans	Akdeniz Üniversitesi	2001
Lise	Ümraniye Lisesi	1997

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	**Kurum**	**Süre (Yıl - Yıl)**
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	**Okuduğunu Anlama***	**Konuşma***	**Yazma***	**KPDS/ÜDS Puanı**	**(Diğer) Puanı**
İngilizce	İyi	İyi	İyi	ÜDS	68

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	**Eşit Ağırlık**	**Sözel**
ALES Puanı	65	67	63
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	**Kullanma becerisi**

Yayınları/Tebligleri Sertifikaları/Ödülleri

Özel İlgi Alanları (Hobileri): Resim, kaligrafi